

*Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polska Akademia Nauk*

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału

Joanna Motyl

**„Znaczenie kinazy sfingozyny-1 oraz
sfingozyno-1-fosforanu w doświadczalnym
modelu choroby Parkinsona oraz
w farmakologicznej cytoprotekcji”**

*Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. med. Joanny B. Strosznajder*

Warszawa, 2017

*Promotorowi mojej pracy **Prof. dr hab. n. med. Joannie B. Strosznajder** składam serdeczne podziękowania za ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego, nieocenioną pomoc, życzliwość i nieustanną mobilizację do pracy, a także za cenne uwagi udzielone w trakcie realizacji niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję wszystkim **Koleżankom i Kolegom z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału** za owocne dyskusje naukowe oraz stworzenie życzliwej atmosfery pracy. Szczególne podziękowania kieruję do **dr Kingi Czubowicz** i **mgr Łukasza Przykazy** z **Zespołu Kliniczno-Badawczego Neurochirurgii** za cenne wskazówki i pomoc w realizacji badań behawioralnych.*

*Niniejszą pracę dedykuję moim **Rodzicom**
i **Mężowi**, z podziękowaniem za wszelką
pomoc i szczerą motywację.*

Większość wyników zamieszczonych w niniejszej rozprawie stanowi treść następujących publikacji:

- **Pyszko J**, Strosznajder JB. Sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate in oxidative stress evoked by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) in human dopaminergic neuronal cells. *Mol Neurobiol.* 2014 ;50(1): 38-48.
- **Pyszko J**, Strosznajder JB. The key role of sphingosine kinases in the molecular mechanism of neuronal cell survival and death in an experimental model of Parkinson's disease. *Folia Neuropathol.* 2014; 52(3): 260-9.

Wyniki prezentowane były również w formie licznych komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Autor uzyskał środki finansowe w ramach:

- finansowania stypendium doktorskiego z Narodowego Centrum Nauki - Etiuda 4 nr 2016/20/T/NZ3/00504
- grantu badawczego Narodowego Centrum Nauki - Preludium 5 nr 2013/09/N/NZ4/02045
- Europejskiego Funduszu Społecznego, projektu systemowego Samorządu Województwa Mazowieckiego: Rozwój nauki – rozwojem regionu - stypendia i wsparcie towarzyszące dla mazowieckich doktorantów (nr umowy 368/ES/ZS-III/W-POKL/14)
- projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 5870/PO1/2011/40.

Spis treści

Objaśnienia skrótów stosowanych w pracy	- 5 -
Wprowadzenie	- 11 -
Choroba Parkinsona	- 11 -
<i>Epidemiologia i klasyfikacja Choroby Parkinsona</i>	- 11 -
<i>Podstawy neuropatologiczne Choroby Parkinsona</i>	- 12 -
<i>Objawy przedkliniczne i kliniczne oraz rozpoznanie Choroby Parkinsona</i>	- 17 -
<i>Główny kierunek terapii Choroby Parkinsona</i>	- 19 -
Model neurotoksyczności MPTP/MPP+ w badaniach Choroby Parkinsona	- 11 -
<i>Molekularny mechanizm śmierci komórek w modelu MPTP/MPP+</i>	- 24 -
Kinazy sfingozyny (Sphk1 i Sphk2)	- 27 -
<i>Znaczenie kinaz sfingozyny i sfingolipidów w fizjologii i patologii komórki</i>	- 27 -
<i>Budowa kinaz sfingozyny</i>	- 29 -
<i>Specyficzność substratowa kinaz sfingozyny</i>	- 31 -
<i>Lokalizacja wewnątrzkomórkowa i rozmieszczenie tkankowe kinaz sfingozyny</i>	- 32 -
<i>Regulacja aktywności kinaz sfingozyny</i>	- 32 -
Sfingozyno-1-fosforan	- 33 -
<i>Metabolizm i mechanizm działania sfingozyno-1-fosforanu</i>	- 33 -
<i>Sfingozyno-1-fosforan w płynach ustrojowych</i>	- 37 -
<i>Receptory dla sfingozyno-1-fosforanu</i>	- 37 -
<i>Rola sfingozyno-1-fosforanu w układzie nerwowym</i>	- 40 -
Rola sfingozyno-1-fosforanu w chorobach neurodegeneracyjnych	- 42 -
Działanie fingolimodu w układzie nerwowym	- 44 -
Założenia i cel pracy	- 47 -
Materiały i Metody	- 49 -
Komórkowy model doświadczalny stresu oksydacyjnego wywołany 1-metylo-4-fenylopirydyną (MPP+)	- 49 -
<i>Ludzka linia komórkowa SH-SY5Y</i>	- 49 -
<i>Warunki hodowli komórek SH-SY5Y</i>	- 50 -
<i>Indukcja stresu oksydacyjnego z użyciem neurotoksyny - 1-metylo-4-fenylopirydyny (MPP+)</i> -	50 -

<i>Charakterystyka i wzory chemiczne związków stosowanych w modelu in vitro</i>	53 -
<i>Otrzymywanie frakcji podkomórkowych</i>	55 -
Zwierzęcy model doświadczalny ChP, wywołany działaniem 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP)	55 -
<i>Zwierzęta doświadczalne</i>	55 -
<i>Procedura podawania MPTP</i>	56 -
<i>Farmakologiczna modyfikacja odpowiedzi wybranych partii mózgu na stres wywołany działaniem MPTP</i>	57 -
<i>Charakterystyka i wzory chemiczne związków stosowanych w modelu in vivo</i>	57 -
<i>Przygotowanie materiału do badań</i>	59 -
Metody spektrofotometryczne	59 -
<i>Oznaczanie stężenia białka</i>	59 -
<i>Analiza żywotności komórek za pomocą testu MTT</i>	59 -
<i>Analiza poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF</i>	60 -
<i>Oznaczanie aktywności Sphk1/2</i>	60 -
Analiza ekspresji genów	60 -
<i>Izolacja RNA</i>	62 -
<i>Reakcja odwrotnej transkrypcji</i>	63 -
<i>Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)</i>	63 -
Metody immunochemiczne	64 -
<i>Immunodetekcja białek metodą Western blot</i>	64 -
<i>Przygotowanie materiału do analizy</i>	64 -
<i>Rozdział elektroforetyczny i immunodetekcja białek</i>	65 -
<i>Wizualizacja jąder komórkowych i analiza procesu apoptozy przy zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej</i>	69 -
Analiza aktywności motorycznej	70 -
<i>Test otwartego pola</i>	70 -
<i>Test Rotarod</i>	70 -
Statystyczne opracowanie wyników	71 -

Wyniki	- 72 -
Badania In vitro	- 72 -
1) Wpływ MPP+ na indukcję stresu oksydacyjnego oraz żywotność komórek SH-SY5Y.....	- 72 -
2) Udział kinaz sfingozyny (Sphk1/2) w mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP+.....	- 75 -
2.1) Poziom aktywności Sphk1/2 w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+	- 75 -
2.2) Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego MPP+ na ekspresję genu/poziom białka Sphk1 w komórkach SH-SY5Y.....	- 77 -
2.3) Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego MPP+ na poziom ekspresji fosfatazy SIP i liazy SIP	- 78 -
2.4) Rola inhibicji Sphk1 w indukcji stresu oksydacyjnego i śmierci komórek SH-SY5Y.....	- 79 -
2.5) Zbadanie poziomu fosforylacji/aktywności kinazy Akt w warunkach farmakologicznej inhibicji Sphk1.....	- 81 -
2.6) Analiza zmian molekularnych, znamienych dla procesu apoptozy w komórkach SH-SY5Y traktowanych SKI II i MPP+	- 82 -
3) Zbadanie roli egzogenego sfingozyno-1-fosforanu (SIP) w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP+	- 86 -
3.1) Analiza wpływu egzogenego SIP na poziom stresu oksydacyjnego oraz żywotność komórek SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+	- 86 -
3.2) Wpływ SIP na ekspresję Sphk1 oraz białek pro-apoptotycznych z rodziny Bcl-2.....	- 87 -
3.3) Identyfikacja apoptozy w obecności SIP w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem MPP+	- 90 -
4) Weryfikacja receptorowego działania egzogenego SIP.....	- 91 -
4.1) Analiza wpływu agonistów, w tym fingolimodu (FTY720) i antagonistów receptorów dla SIP na żywotność komórek SH-SY5Y traktowanych MPP+	- 91 -
4.2) Poziom ekspresji receptora SIPR1 w warunkach inkubacji z MPP+	- 93 -
4.3) Porównanie wpływu SIP oraz inhibitora kaspaz na żywotność komórek SH-SY5Y traktowanych MPP+	- 93 -
5) Żywotność komórek SH-SY5Y poddanych pre-inkubacji z pramipeksolem (PPX) w warunkach stresu wywołanego MPP+	- 94 -
Badania in vivo	- 96 -
1) Wpływ FTY720 na poziom immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH-IR) w prążkowiu i śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Porównanie z PPX.....	- 96 -
2) Aktywność/ekspresja Sphk1 w prążkowiu i śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Wpływ FTY720 i PPX.....	- 97 -
3) Badanie poziomu fosforylacji/aktywności kinazy Akt i wybranych zmian molekularnych w prążkowiu i śródmózgowiu myszy poddanych działaniu FTY720 w modelu ChP. Porównanie z efektem PPX	- 99 -

4) Wpływ PPX i FTY720 na aktywność ruchową myszy po podaniu MPTP.....	- 103 -
4.1) Aktywność ruchowa myszy mierzona w teście otwartego pola.....	- 103 -
4.2) Aktywność ruchowa myszy mierzona w teście Rotarod	- 109 -
Dyskusja	- 111 -
Podsumowanie	- 133 -
Wnioski	- 134 -
Streszczenie	- 135 -
Summary	- 140 -
Literatura	- 144 -

Objaśnienia skrótów stosowanych w pracy

5HT – serotonina

6-OHDA - 6-hydroksydopamina

a.u.- arbitralna jednostka (ang. arbitrary unit)

ABC – rodzina białek transportowych, posiadających kasetę wiążącą ATP (ang. ATP-binding cassette transporters)

AP-1 - czynnik transkrypcyjny (ang. activating protein-1)

Apaf-1 - czynnik aktywujący proteazy w apoptozie (ang. apoptosis protease-activating factor 1)

Apoc. - inhibitor oksydazy NADPH – 4'-hydroksy-3'-metoksyacetofenon, synonim – apocynina

ApoM - apolipoproteina M

APP - białko prekursorowe amyloidu β (ang. amyloid beta precursor protein)

ASN - α -synukleina

ATP – adenzynotrójfosforan

A β - amyloid beta

BACE - β -sekretaza amyloidu beta

BAX (gen kodujący *bax*) – białko pro-apoptotyczne z rodziny Bcl-2

Bcl-2 (gen kodujący *bcl2*) - białko anty-apoptotyczne z rodziny Bcl-2

BDNF - neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor)

BH – domena białek z rodziny Bcl-2 (ang. Bcl-2 homology)

BSA - surowica bydlęca (ang. bovine serum albumin)

CARD – domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (ang. caspase activation and recruitment domain)

CDK - kinazy zależne od cyklin (ang. cyclin dependent kinases)

CEM - mikrodomeny bogate w kaweolinę (ang. caveolin-enriched microdomain)

ChA - Choroba Alzheimerera

ChP - Choroba Parkinsona

CIB1 – białko wiążące wapń i integrynę 1 (ang. calcium- and integrin-binding protein 1)

CREB – czynnik transkrypcyjny (ang. cAMP-response-element-binding protein)

DA – dopamina

- DAG** – diacyloglicerol
- DAT** - transporter dopaminy
- DBS** - głęboka stymulacja mózgu (ang. deep brain stimulation)
- DCF** - 2',7'-dichlorofluoresceina
- DJ-1** – białkowa deglikaza, kodowana przez PARK7
- DLB** - choroba otępienna z ciałami Lewy'ego (ang. dementia with Lewy bodies)
- DMSO** - dimetylosulfotlenek
- DOPAC** – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy
- DPPH** - 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl
- DTT** – ditiotreitrol
- EC₅₀** – (ang. effective concentration) medialne stężenie skuteczne, wartość stężenia danej substancji, która indukuje w danych warunkach (w tym przypadku w medium hodowlanym) określony efekt w 50% wartości maksymalnej
- EDTA** - sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
- EGTA** - kwas etylenoglikol-O-O'-bis (2-aminoetyl)-N,N,N',N'tetraoctowy
- ER** - siateczka śródplazmatyczna (ang. endoplasmic reticulum)
- ERK1/2** - kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. extracellular signal regulated kinase)
- FBS** - cieleca surowica płodowa (ang. fetal bovine serum)
- FTY720** - fingolimod
- FTY720-P** - ufosforylowany fingolimod
- GAPDH** - dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego (ang. glyceraldehyde 3-phosphodehydrogenase)
- GPCR** - błonowe receptory sprzężone z białkami G (ang. G-protein-coupled receptors)
- GPe** - gałka biała zewnętrzna (łac. *globus pallidus externus*)
- GPi** - gałka biała wewnętrzna (łac. *globus pallidus internus*)
- GPx** – peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)
- GPx-4** - peroksydazy wodoronadtlenków fosfolipidowych
- GSK-3** - kinaza 3 syntazy glikogenu (ang. glycogen synthase kinase 3)
- H₂DCF** - 2',7'-dwuchlorodwuhydrofluorescyna
- H₂DCF-DA** - dwuoctan 2',7'-dwuchlorodwuhydrofluoresceiny
- HDAC1, 2** - deacetylazy histonowe 1,2 (ang. histone deacetylases 1, 2)
- HEPES** - kwas 2-[4-(2-hydroksetylo)-1-piperazyno]etanosulfonowy

Hex – heksadecenal

Hrk (gen kodujący *hrk*) – harakiri, białko pro-apoptyczne z rodziny Bcl-2

HVA – kwas homowanilinowy

IVC system – system indywidualnie wentylowanych klatek (ang. individually ventilated cage system)

JNK - kinaza N-końcowa c-JUN (ang. c-Jun NH₂-terminal kinase)

LC - miejsce sinawe (łac. *locus coeruleus*)

LC₅₀ - (ang. lethal concentration) medialne stężenie śmiertelne, wartość stężenia danej substancji, po narażeniu na którą można oczekiwać, że w czasie ekspozycji nastąpi zgon 50% organizmów narażonych na tę substancję (w tym przypadku żywotność komórek maleje do połowy wartości kontrolnej hodowli komórek inkubowanej bez badanego związku, ale w tych samych warunkach)

LDH - dehydrogenaza mleczanowa (ang. lactate dehydrogenase)

LPS - lipopolisacharyd

LRRK2 - kinaza druga związana z powtórzeniami bogatymi w leucynę (ang. leucine-rich repeat kinase 2)

MAO-B - monoaminooksydaza typu B

MAPK - kinazy aktywowane mitogenami (ang. mitogen activated protein kinases)

MEM - medium Eagle`a (ang. Minimum Essential Medium Eagle)

MFS - super-rodzina transporterów błonowych (ang. major facilitator superfamily)

MPDP+ - 1-metylo-4-fenylo-2,3-dihydropirydyna

MPP+ - 1-metylo-4-fenylopirydyna

MPPP - 1-metylo-4-fenylo-4-propionoamidoksyperydyna, syntetyczna heroina

MPTP - 1-metylo-4-fenylo- 1,2,3,6-tetrahydropirydyna

MRI - rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance imaging)

MTT - bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy

NADH - dwunukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma zredukowana

NADPH - ester fosforanowy dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma zredukowana

NBM - jądro podstawne Meynerta (ang. basal nucleus of Meynert)

NES - sekwencja odpowiedzialna za eksport z jądra do cytoplazmy (ang. nuclear export sequence)

NF-κB - czynnik jądrowy kappa B (ang. nuclear factor kappa B)

- NGF** - czynnik wzrostu neuronów (ang. neuronal growth factor)
- NLS** - sekwencja lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization sequence)
- NMDA** - kwas N-metylo-D-asparaginowy
- NPC** - neuronalne komórki progenitorowe (ang. neural progenitor cells)
- OUN** - ośrodkowy układ nerwowy
- PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. polyacrylamide gel electrophoresis)
- PARP-1** - polimeraza poli(ADP-rybozy)
- PBS** - bufor fosforanowy – buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. phosphate buffer saline)
- PDGF** - płytkowopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor)
- PET** - pozytonowa tomografia emisyjna (ang. positron emission tomography)
- PHB2** - prohibityna 2 (ang. prohibitin 2)
- Phe** – fosfoetanolamina
- PI3K** - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. phosphoinositide 3-kinase)
- PKB/Akt** - kinaza białkowa B (ang. protein kinase B/Akt)
- PKC** - kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)
- PMSF** - fluorek fenylometylosulfonylu, inhibitor proteaz serynowych
- PPX** – pramipeksol, agonista receptorów dopaminergicznych D2/D3
- PVDF** - polifluorek winylidenu
- r.ż.** – rok życia
- RA** – kwas retinowy (ang. retinoic acid)
- Raf** - serynowo-treoninowa kinaza
- Ras** - małe białko G
- RBD** – zaburzenia snu w fazie REM (ang. rapid-eye-movement sleep behaviour disorder)
- REM** - faza snu, w której występują szybkie ruchy gałek ocznych (ang. rapid-eye-movement)
- RFT** - reaktywne formy tlenu
- RLS** - zespół niespokojnych nóg (ang. restless legs syndrome)
- RT-PCR** - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction)
- S** - prążkowie (łac. *striatum*)
- S1P** - sfingozyno-1-fosforan (ang. sphingosine-1-phosphate)

- S1PR1-5** - receptory dla sfingozyno-1-fosforanu (ang. sphingosine-1-phosphate receptors)
- SDS** - dodecylosiarczan sodowy
- SDS-PAGE** - rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).
- Ser** – seryna
- SK1a, SK1b** - 2 warianty kinazy sfingozyny 1, powstałe w wyniku alternatywnego składania prekursorowego mRNA
- SK1a, SK1b** - 2 warianty kinazy sfingozyny 2, powstałe w wyniku alternatywnego składania prekursorowego mRNA
- SKI II** - inhibitor Sphk1 - 2-(p-hydroksyanilino)-4-(p-chlorofenylo)tiazol
- SM** - stwardnienie rozsiane (łac. *sclerosis multiplex*)
- SN** - istota czarna (łac. *substantia nigra*)
- SNCA** - nazwa genu kodującego α -synukleinę
- SNpc** – część zbita istoty czarnej (łac. *substantia nigra pars compacta*)
- SOD2** –mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa
- SPECT** - tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (ang. single-photon emission computed tomography)
- Sph** -sfingozyna
- Sphk1 (gen kodujący *sphk1*)** – kinaza sfingozyny 1(ang. sphingosine kinase 1)
- Sphk2 (gen kodujący *sphk2*)** – kinaza sfingozyny 2 (ang. sphingosine kinase 2)
- SPL (gen kodujący *sgpl1*)** - liaza sfingozyno-1-fosforanu (ang. sphingosine-1-phosphate lyase)
- Spns2** - białko Spinster 2, transporter sfingozyno-1-fosforanu
- SPP1 (gen kodujący *spp1*)** - fosfataza sfingozyno-1-fosforanu 1 (ang. sphingosine-1-phosphate phosphatase 1)
- SPP2** - fosfataza sfingozyno-1-fosforanu 2 (ang. sphingosine-1-phosphate phosphatase 2)
- STN** - jądro niskowzgórzowe (łac. *nucleus subthalamicus*)
- STS** – staurosporyna, aktywator apoptozy zależnej od kaspaz
- TH** - hydroksylaza tyrozynowa (ang. tyrosine hydroxylase)
- THA** - wzgórze (łac. *thalamus*)
- TH-IR** – immunoreaktywność hydroksylazy tyrozynowej (ang. tyrosine hydroxylase-immunoreactivity)

Thr - Treonina

TK - tomografia komputerowa

TNF- α - czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor)

TRAF2 - czynnik związanym z receptorem dla TNF- α

VMAT2 - pęcherzykowy transporter monoamin (ang. vesicular monoamine transporter)

VTA - pole brzuszne nakrywki (ang. ventral tegmental area, łac. *area tegmentalis ventralis*)

WR - wolne rodniki

YAP - koaktywator czynników transkrypcyjnych

Z-DEVD-FMK - keton Z-Asp(O-Me)-Glu(O-Me)-Val-Asp(O-Me)fluorometylowy, inhibitor kaspazy-3

Wprowadzenie

Choroba Parkinsona

Epidemiologia i klasyfikacja Choroby Parkinsona

Choroba Parkinsona (łac. *morbus Parkinsoni*, ChP) została po raz pierwszy scharakteryzowana w roku 1817 przez londyńskiego lekarza Jamesa Parkinsona, który nazwał ją drżączką porażną (łac. *paralysis agitans*), a wyniki opublikował w jednej z najczęściej cytowanych prac „An Essay on the Shaking Palsy” (Parkinson 1817). ChP jest po Chorobie Alzheimerera (ChA) drugą, co do częstości występowania chorobą neurodegeneracyjną, charakteryzującą się rosnącym współczynnikiem zapadalności. Wyniki globalnej meta-analizy epidemiologicznej, przeprowadzonej w oparciu o dane z baz Medline i Embase z lat 2001-2014 wskazują na znamienny wzrost zapadalności na ChP wraz z wiekiem. U kobiet w wieku 40-49 lat średnia zapadalności wynosi 3,26 przypadków na 100 tys. osób i wzrasta do 103,48 w przypadku kobiet po 80. r.ż. U mężczyzn w przedziale wiekowym 40-49 lat średnia zapadalności na ChP wynosi 3,57 przypadków na 100 tys. osób i wzrasta do 258,47 po 80. r.ż. (Hirsch i wsp. 2016). Liczba zdiagnozowanych pacjentów wśród mężczyzn jest wyższa w stosunku do kobiet i wynosi odpowiednio 1,5:1 (Wooten 2004), a według niektórych źródeł nawet 3:1 (Dexter i Jenner 2013). Niższa zachorowalność kobiet koreluje pozytywnie z długością wieku rozrodczego i stosowaniem hormonalnej terapii zastępczej w okresie pomenopauzalnym, co wskazuje na protekcyjną rolę estrogenów (Wang i wsp. 2014; Nitkowska i wsp. 2014). W populacji kaukaskiej częstość występowania ChP określa się na 0,12-0,18% populacji generalnej. W populacji azjatyckiej zachorowalność na tę chorobę jest wyraźnie niższa (0,015-0,018%) (Sławek 2014). Wyniki te wskazywać mogą z jednej strony na istotną rolę czynników genetycznych w patogenezie choroby, ale także na zróżnicowany dostęp do opieki medycznej. Średni wiek zachorowania na ChP wynosi 58 lat, jednak choroba może zaczynać się wcześniej. Przypadki zachorowań przed 30. r.ż. określane są jako młodzieńczy parkinsonizm (ang. juvenile parkinsonizm), zaś przed 40. r.ż. jako ChP o wczesnym początku (ang. young-onset Parkinson’s disease) (Fiszer i Bogucki 2014). W Polsce na ChP cierpi 80–120 tys. osób, przy czym każdego roku diagnozuje się około 8 tys. nowych przypadków (Mutschler i wsp. 2012). Do roku 2030 przewiduje się podwojenie liczby chorych na ChP na całym świecie, co stanowi poważny problem

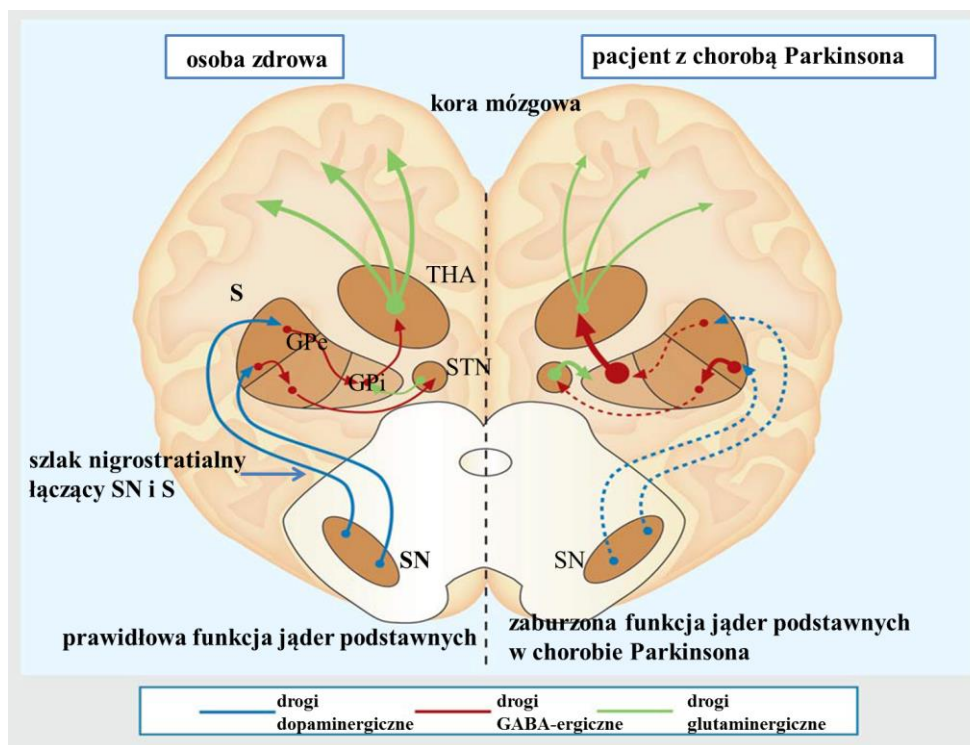
zarówno kliniczny, jak i ekonomiczno-społeczny w dobie starzejącego się społeczeństwa Europy, w tym również społeczeństwa Polski (Dorsey i wsp. 2007). Różnorodne postacie parkinsonizmu można podzielić na cztery zasadnicze grupy (Sławek 2011, 2014):

- ChP (tzw. idiopatyczna), określana jako parkinsonizm pierwotny, która może występować jako postać sporadyczna oraz rodzinna, genetycznie uwarunkowana, w tym o wczesnym początku.
- Parkinsonizm o charakterze wtórnym bądź objawowym, o znanej przyczynie zaburzającej czynność/uszkodzającej ośrodkowy układ nerwowy (OUN). W tej grupie wyróżnić można m.in.: parkinsonizm polekowy (powstały w wyniku terapii m.in. neuroleptykami, blokerami kanałów wapniowych, α -metyldopą), toksyczny (na skutek zatruc m.in. tlenkiem węgla, pestycydami), naczyniowy, parkinsonizm w przebiegu wodogłowa normotensyjnego, encefalopatii wątrobowej i zaburzeń endokrynologicznych.
- Parkinsonizm powstały w przebiegu chorób zwyrodnieniowych OUN innych niż ChP (parkinsonizm-plus). Do tej grupy należą m.in.: Choroba otępienna z ciałami Lewy'ego (ang. dementia with Lewy bodies, DLB), zanik wieloukładowy oraz postępujące porażenie ponadjardowe.
- Parkinsonizm powstały w przebiegu zwyrodnień metabolicznych i dziedzicznych OUN, m.in.: Choroby Wilsona, rodzinnego zwapnienia jąder podstawy (Choroby Fahra) oraz otępienia czołowo-skroniowego z parkinsonizmem związanym z chromosomem 17.

Podstawy neuropatologiczne Choroby Parkinsona

U podłoża ChP leżą nie tylko postępujące, wieloneuronalne zaburzenia w obrębie układu pozapiramidowego, regulującego funkcje motoryczne, ale także zmiany zwyrodnieniowe i masywne obumieranie neuronów struktur limbicznych i odpowiednich obszarów kory, zaangażowanych w regulację procesów poznawczych. Najważniejsze zaburzenia dotyczą dopaminergicznego szlaku czarnoprążkowiowego, który reguluje napęd ruchowy, koordynację, a także siłę napięcia mięśni szkieletowych (Mutschler i wsp. 2012). Szlak czarnoprążkowiowy rozpoczyna się ciałami neuronów dopaminergicznych w części zbitej istoty czarnej (łac. *substantia nigra pars compacta*),

których aksony sięgają swymi zakończeniami prążkowie (łac. *striatum*). Istota czarna, która swą nazwę zawdzięcza ciemnemu zabarwieniu wynikającemu z dużej zawartości żelaza i melaniny oraz prążkowie (jądro ogoniaste i skorupa) należą do jąder podstawy, czyli podkorowych skupisk istoty szarej. Jądra podstawy uczestniczą w selekcji oraz przetwarzaniu motorycznych wzorców zachowań. Obecnie postuluje się również, że mają one istotną rolę w kontroli procesów emocjonalnych i poznawczych (Laskowska 2009). Stwierdzono ponadto degenerację neuronów dopaminergicznych w polu brzusznej nakrywki (łac. *ventral tegmental area*, VTA). Zakończenia nerwowe tych komórek dochodzą do struktur układu limbicznego, co może tłumaczyć występowanie apatii, niższej samooceny oraz depresji u osób z ChP (Lieberman 2006). W początkowym okresie schorzenia zanik neuronów łączących istotę czarną z prążkowie może być funkcjonalnie wyrównywany przez procesy adaptacyjne, jednak gdy postępująca utrata komórek dopaminergicznych sięgnie 50%, wyrównanie czynnościowe przestaje być możliwe (Noyce i wsp. 2016; Schrag i wsp. 2015). Konsekwencją jest zachwianie homeostazy licznych układów neuroprzekąźnikowych, które wynika również z degeneracji neuronów cholinergicznych jądra podstawnego Meynerta (ang. basal nucleus of Meynert, NBM), z uszkodzenia neuronów noradrenergicznych jądra miejsca sinawego (łac. *locus coeruleus*, LC) i neuronów serotoninericznych jąder szwu (Jellinger 1991; Bertrand i wsp. 1997). W ChP bserwuje się obniżenie aktywności enzymów syntetyzujących katecholaminy, w tym hydroksylazy tyrozynowej (TH), dekarboksylazy fenyloetyloalaninowej i hydroksylazy tryptofanu - enzymu odpowiadającego za syntezę serotoniny (5HT). Wyniki badań dotyczące zmiany ilości neuronów 5HT są niejednoznaczne. Ostatnie badania Cheshire i wsp. (2015) nie wykazały zmian w gęstości neuronów 5HT w jądrze grzbietowym szwu. Ostatecznie w układzie pozapiramidowym dochodzi do nasilenia hamującej aktywności GABA-ergicznej neuronów przekazujących informację w kierunku wzgórza, które prowadzi do hamowania aktywności glutaminergicznej dróg wiodących ze wzgórza do kory (**Schemat 1.**).



Schemat 1. Udział szlaku czarnoprążkowiowego w patomechanizmie choroby Parkinsona. Zmodyfikowano wg Mutschler i wsp. (2012).

objaśnienia skrótów: SN – istota czarna (łac. substantia nigra), S – prążkowie (łac. striatum), GPe – gałka biała zewnętrzna (łac. globus pallidus externus), GPi – gałka biała wewnętrzna (łac. globus pallidus internus), STN – jądro niskowzgórzowe (łac. nucleus subthalamicus), THA – wzgórze (łac. thalamus). Grubość linii strzałek odpowiada stopniowi aktywacji neuronów.

Aktualnie w etiopatogenezie ChP uwzględniane są zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, które stały się podstawą teorii „podwójnego uderzenia” (ang. double hit). Badania epidemiologiczne wskazują na częstsze zachorowania ludności wiejskiej, pijącej wodę ze studni zanieczyszczonej pestycydami (Breckenridge i wsp. 2016). Liczne przypadki parkinsonizmu odnotowano wśród studentów, zażywających heroinę zanieczyszczoną toksyną - 1-metylo-4-fenilo- 1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP), czy też wśród osób stosujących efedron zanieczyszczony manganem (Langston i wsp. 1983; de Bie i wsp. 2007). Pomimo tej samej ekspozycji na czynniki środowiskowe, nie w każdym przypadku dochodziło do wystąpienia parkinsonizmu, co wskazywać może na istotną rolę czynników genetycznych w etiopatogenezie ChP. Pokrewieństwo z osobą chorą, oprócz wieku pacjenta jest najczęstszym czynnikiem ryzyka ChP. Monogeniczne postacie ChP stanowią ok. 10% wszystkich jej przypadków (Noyce i wsp. 2016; Olanow

i Brundin 2013). Pierwszy opis predyspozycji genetycznej ChP dotyczył rodziny Contursi z południa Włoch. Wykryto wówczas mutację w genie kodującym białko α -synukleiny (ASN). Aktualnie w ChP zidentyfikowano i opisano 18 mutacji, dziedziczonych autosomalnie zarówno dominująco, jak i recesywnie. Najczęściej występujące mutacje dotyczą genów kodujących ASN, parkinę, czy kinazę drugą związaną z powtórzeniami bogatymi w leucynę (ang. leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2). Ponadto opisywane są nowe mutacje tych samych genów (ponad 100 dla genu parkiny), co świadczy o znacznej heterogenności choroby (Trinh i Farrer 2013; Sato i wsp. 2016).

Obecnie uważa się, że do śmierci neuronów dopaminergicznych może dochodzić w mechanizmie uwarunkowań genetycznych, ale także w wyniku przyspieszonego starzenia, stresu oksydacyjnego, procesów zapalnych, w tym przewlekłej reakcji zapalnej mikrogleju (Alam i wsp. 2016; Friedman 2005). Współczesna definicja ChP zakłada, że schorzenie to należy do zespołu chorób neurodegeneracyjnych określanymi wspólnym mianem synukleinopatii, do których należą również ChA, atrofia wielosystemowa i DLB (Spillantini i Goedert 2000; Forloni i wsp. 2016). W chorobach tych dochodzi do szerzenia się nieprawidłowej konformacji białka ASN (Olanow i wsp. 2004; Walsh i Selkoe 2016). Zgodnie z aktualną hipotezą synukleinopatii, ChP może mieć swój początek w opuszcze węchowej i jądrze grzbietowym nerwu błędnego, gdzie najwcześniej obserwuje się występowanie wewnątrzneuralnych, cytoplazmatycznych wtrętów, zbudowanych głównie z białka ASN, występujących w formie ciał Lewy'ego (Lewy body, LB) i neurytów Lewy'ego (Braak i wsp. 2003). LB zostały po raz pierwszy opisane w 1912 r. przez Friedricha H. Lewy'ego, wybitnego ucznia Alojzego Alzheimera (Lewy 1912). Analiza rozmieszczenia zagregowanego białka ASN w układzie nerwowym oraz w formie ciał i neurytów Lewy'ego z uwzględnieniem stanu klinicznego pacjentów umożliwiła zaproponowanie i opracowanie rozwoju ChP przez Braak'a i wsp. (2003, 2004). Badacze Ci zaobserwowali 6 faz rozwoju ChP. W rozpoczynającej ją fazie pierwszej stwierdzili oni zmiany neurodegeneracyjne w jądrach ruchowych nerwu błędnego oraz w opuszkach węchowych. W fazie drugiej zmiany obserwuje się w moście, w jądrze szwu oraz w wielokomórkowym jądrze siateczkowym, a dopiero w fazie trzeciej ChP pojawiają się zmiany w substancji czarnej i w neuronach cholinergicznym jądra komorowo-mostowego. W fazie czwartej uszkodzenia obejmują obszary układu limbicznego, w tym hipokamp. Faza piąta i szósta to pełny zespół zaburzeń

charakterystyczny dla ChP ze zmianami neuropatologicznymi w korze, nie tylko ruchowej ale i czuciowej oraz w korze asocjacyjnej. W warunkach fizjologicznych białko ASN występuje w formie monomerycznej. W stężeniu nanomolowym lokalizuje się ono głównie w zakończeniach presynaptycznych. Wykazuje ono zdolność wiązania z błonami lipidowymi i bierze udział w kształtowaniu plastyczności synaptycznej, w uwalnianiu dopaminy (DA) i innych neurotransmiterów (Murphy i wsp. 2000; Cabin i wsp. 2002; Wilkaniec i wsp. 2013). W przypadku gdy ASN osiągnie odpowiednio wysokie stężenie wewnątrz neuronu może dochodzić do powstawania toksycznych oligomerów (Forloni i wsp. 2016; Wilkaniec i wsp. 2013). Ponadto, ASN o nieprawidłowej konformacji może indukować zmiany w sąsiednich komórkach, podobnie jak w chorobach prionowych (Olanow i Brundin 2013, Dunning i wsp. 2012; Goedert i wsp 2010; Walsh i Selkoe 2016). Białko to uwalniane jest również na zewnątrz komórki. ASN wykrywalna jest w płynie mózgowo-rdzeniowym, osoczu, ślinie, jak również w medium komórek hodowlanych (El-Agnaf i wsp. 2003; Jang i wsp. 2010; Lee i wsp. 2005). Badania dowodzą, że kluczową rolę w uwalnianiu ASN na zewnątrz komórki odgrywa stres oksydacyjno/nitrozacyjny (Adamczyk i wsp. 2007; Jang i wsp. 2010; Lee i wsp. 2005). Badania Adamczyk i wsp. (2006) wykazały, że zewnątrzkomórkowa ASN może hamować wychwyty zwrotny DA w mechanizmie blokowania transportera dopaminy (DAT), co z kolei indukuje stres oksydacyjny w synaptosomach. DA w obecności reaktywnych form tlenu (RFT) ulega utlenianiu nieenzymatycznemu i enzymatycznemu do chinonów DA, najprawdopodobniej za pomocą oksydaz. Produkty autooksydacji DA mogą wchodzić w interakcje z ASN i modulować proces agregacji tego białka, jak również zwiększać uwalnianie ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Norris i wsp. 2003; Bisaglia i wsp. 2007; Lee i wsp. 2011b). W warunkach fizjologicznych monomeryczna ASN reguluje homeostazę DA poprzez wpływ na aktywność TH, która jest enzymem kluczowym dla syntezy tego neurotransmitera. Agregacja i uwalnianie ASN z komórki może prowadzić do zaburzenia metabolizmu DA i nasilenia zmian oksydacyjnych tego neurotransmitera (Perez i Hastings 2004). Zewnątrzkomórkowa ASN może wywierać swą toksyczność także jako regulator napływu jonów Ca^{2+} przez kanały wapniowe. W wyniku pobudzenia receptora NMDA i neuronalnej syntazy tlenu azotu dochodzi do wzrostu poziomu NO i zależnej od NO aktywacji kaspazy-3, a w konsekwencji do apoptozy zależnej od kaspaz (Adamczyk i Strosznajder 2006;

Adamczyk i wsp. 2009; 2010). ASN zwiększa też uwalnianie peptydów amyloidu beta (A β), prowadzi do dysfunkcji mitochondriów i obniżenia żywotności komórek nerwowych (Kaźmierczak i wsp. 2008).

Objawy przedkliniczne i kliniczne oraz rozpoznanie Choroby Parkinsona.

ChP charakteryzuje się zarówno objawami ruchowymi, jak i pozaruchowymi, których stwierdzenie stanowi podstawę rozpoznania ChP. Kliniczne kryteria rozpoznania zostały opracowane przez zespół specjalistów stworzony przez Movement Disorder Society (Litvan 2003). Są to kryteria Brytyjskiego Banku Mózgów chorych na ChP (ang. UK Parkinson's Disease Society Brain Bank) zgodnie z którymi do głównych objawów ChP należą:

- spowolnienie ruchowe (bradykinezja): zaburzona zdolność inicjowania ruchu, spowolnienie i zmniejszenie amplitudy ruchu podczas jego powtarzania, spowolnienie ruchów całego ciała. Oprócz bradykinezji występuje co najmniej jeden z pozostałych objawów:
 - sztywność mięśniowa o charakterze plastycznym, tzw. objaw „rury łożowanej”,
 - drżenie spoczynkowe (4-6 Hz),
 - niestabilność postawy (występująca niezależnie od zaburzeń wzrokowych, mózdkowych, błędniakowych, czy zaburzonego czucia proprioceptywnego).

Powyższych objawów nie można wytłumaczyć innymi schorzeniami. Ponadto wystąpić powinny co najmniej 3 z poniższych kryteriów wspomagających rozpoznanie:

- jednostronny początek,
- spoczynkowy charakter drżenia,
- postępujący charakter schorzenia,
- dobra odpowiedź na L-dopę (przez 5 lat lub więcej),
- dyskinezy po leczeniu L-dopą,
- przebieg choroby (10 lat lub więcej).

Do charakterystycznych objawów ChP należą ponadto: mikrografia, mowa dyzartryczna: powolna, niewyraźna, afoniczna, pozbawiona intonacji, hipomimika (tzw. „twarz pokerzysty”), pochylona sylwetka ciała, chód drobnymi krokami, nieodrywanie stóp od podłoża (chód szurający), dystoniczne (zgięciowe w zakresie stawów śródrečno-paliczkowych i łokciowych) ustawienie kończyny górnej. Ocena stopnia zaawansowania

wg skali oceny Hoehn i Yahra (1967) uwzględnia 5 stadiów choroby, gdzie w stadium pierwszym stwierdza się jednostronne objawy ruchowe o niewielkim nasileniu, a w stadium piątym chory jest na wózku inwalidzkim lub leżący i wymaga stałej opieki.

Należy zaznaczyć, że pomimo stosowania kryteriów UK Parkinson's Disease Society Brain Bank nawet w najlepszych ośrodkach na świecie kliniczne rozpoznanie ChP może być negatywnie weryfikowane badaniem neuropatologicznym *post mortem* (Hughes i wsp. 1992). Powyższe kryteria obejmują jedynie objawy ruchowe. W obrazie klinicznym choroby istotne znaczenie mają również objawy pozaruchowe, do których należą zaburzenia węchu oraz objawy układu wegetatywnego tj: zaparcia, ślinotok, łzawienie, podwyższone wydzielanie łju, zaburzona termoregulacja i wydzielanie potu, hipotonia ortostatyczna, czynnościowe zaburzenia pęcherza moczowego (szczególnie w nocy, tzw. nokturia) oraz zaburzenia seksualne (Schrag i wsp. 2015; Langston 2006). Zaparcia są typowym objawem autonomicznym rozwiniętej ChP, jednak mogą one wyprzedzać klasyczny początek choroby nawet o wiele lat (Svensson i wsp. 2016). Znamionym objawem prodromalnym są także zaburzenia węchu, co pozostaje w słuszności z badaniami Braak'a, który na podstawie badań histopatologicznych mózgow pacjentów z ChP wskazał miejsce początku choroby w opuszce węchowej i jądrze grzbietowym nerwu błędnego (Braak i wsp. 2003, 2004; Ponsen i wsp. 2004).

Zarówno w obrazie przedklinicznym, jak i klinicznym choroby występują często zaburzenia neuropsychiatryczne typu depresji i zwiększonego poziomu lęku, zaburzenia snu oraz zaburzenia poznawcze (Beavan i wsp. 2015; Schrag i wsp. 2015; Adams-Carr i wsp. 2015; Chaudhuri i Schapira 2009; Stocchi i Stirpe 2014; Litvan i wsp. 2012). O ile degeneracja neuronów dopaminergicznych prawdopodobnie związana jest z objawami ruchowymi, zaburzenia poznawcze i zmiany nastroju związane są z niewydolnością układu cholinergicznego i serotonergicznego (Ohno i wsp. 2015; Bohnen i wsp. 2015). Podobnie jak powyższe objawy układu autonomicznego, zaburzenia neuropsychiatryczne mogą wystąpić nawet kilkanaście lat przed wystąpieniem typowego dla ChP obrazu klinicznego. Należą do nich: depresyjne obniżenie nastroju i zachowania lękowe (występują u 40% pacjentów), zaburzenia snu w fazie REM (ang. rapid-eye-movement sleep behaviour disorder, RBD), trudności w zasypianiu, nadmierna senność w ciągu dnia, zespół niespokojnych nóg (ang. restless legs syndrome, RLS), wydłużenie procesów

myślowych, apatia, szybkie męczenie się, a w późnych okresach spowolnienie toku myślenia (bradyfrenia) oraz otępienie.

Pomocniczo w diagnostyce wtórnych zespołów parkinsonowskich wykonuje się badania neuroobrazowe: tomografię komputerową (TK) i rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance imaging, MRI). Pojawienie się izotopowych znaczników, mających powinowactwo do części presynaptycznej układu przekaźnikowego w szlaku istota czarna-prążkowie stworzyło możliwość neuroobrazowania układu pozapiramidowego i wczesnego rozpoznania choroby. Zastosowanie dla celów klinicznych metod pozytronowej tomografii emisyjnej (ang. positron emission tomography, PET) oraz tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (ang. single photon emission computed tomography, SPECT) ograniczone jest jednak wysokim kosztem (Dąbrowska i wsp. 2015; Zhu i wsp. 2014). Zmiany w mózgu pacjentów z ChP w znacznej mierze odzwierciedla skład płynu mózgowo-rdzeniowego, którego markerami są przede wszystkim ASN, białkowa deglikaza, kodowana przez PARK7 - DJ-1, ale także peptydy A β i białko Tau, znamienne dla ChA, które korelują z zaburzeniami poznawczymi (Magdalina i wsp. 2014). Z uwagi na kosztowną i inwazyjną procedurę nakłucia lędźwiowego poszukuje się biomarkerów ChP w innych tkankach. Pozytywną korelację między poziomem pozamózgowej ASN a występowaniem ChP wykryto w skórze (Donadio i wsp. 2014), jelitach (Lebouvier i wsp. 2010) i gruczołach ślinowych (Beach i wsp. 2013). Badanie materiału biopsyjnego tkanek obwodowych nie należy aktualnie do rutynowej diagnostyki ChP, lecz w przyszłości może usprawnić wczesne rozpoznanie choroby.

Główny kierunek terapii Choroby Parkinsona

Mimo złożonego podłoża ChP, leczenie farmakologiczne choroby opiera się na aktywacji układu dopaminergicznego przez podawanie penetrującego do mózgu prekursora DA (L-dopy), stymulacji ośrodkowych receptorów dopaminergicznych za pomocą bezpośrednich agonistów (m.in. pramipeksolu, ropinirolu) i hamowaniu metabolizmu DA (stosowanie inhibitorów monoaminooksydazy typu B, MAO-B tj. selegiliny i rasagiliny). Terapia polega też na tłumieniu przekaźnictwa cholinergicznego (stosowanie cholinolityków o działaniu ośrodkowym, np. biperidenu, triheksyfenidylu) (Mutschler i wsp. 2012). Należy zaznaczyć, że ilość DA zmniejsza się

fizjologicznie o 6-8% w każdej dekadzie życia i u zdrowych osób w wieku sześćdziesięciu lat wynosi ok. 40-50% wartości wyjściowej. W przypadku pacjentów z ChP zawartość DA w prążkowie obniża się do 20% wyjściowej wartości stężenia tego neuroprzekaźnika w mózgu (Forno 1996; Pytka i wsp. 2013). Podawanie analogu DA – L-dopy, określanej mianem „złotego standardu” przynosi wówczas ograniczoną czasem kuracji poprawę stanu zdrowia pacjenta przez tłumienie objawów ruchowych choroby, jednak pozostaje bez wpływu na jej postęp. W zaawansowanych stadiach ChP, którym towarzyszy postępujący zanik neuronów dopaminergicznych i zmniejszona reaktywność receptorów, typowy jest rozwój zjawiska określanego jako objaw wyczerpywania (ang. *wearing off*), któremu towarzyszą fluktuacje motoryczne. Dana dawka L-dopy poprawia stan ruchowy pacjenta przez krótki czas, ale sztywność i bradykineza powracają gwałtownie po wyczerpaniu stężenia terapeutycznego leku, co wiąże się z koniecznością zwiększenia dawki i częstości jego podawania oraz nasilenia działań niepożądanych w postaci dyskinez, czyli nadmiernych i nieprawidłowych ruchów mimowolnych (Mutschler i wsp. 2012).

Dla grupy chorych w zaawansowanej postaci ChP w ostatnich latach jako alternatywę konwencjonalnej terapii doustnej opracowano neurochirurgiczne oraz infuzyjne metody postępowania. Aktualnie rekomendowaną metodą neurochirurgiczną jest stymulacja struktur głębokich mózgu (DBS – ang. *deep brain stimulation*). Metoda ta nie wyklucza stosowania farmakoterapii w dalszym etapie choroby. Jej główne przeciwwskazania to brak reakcji na L-dopę, towarzyszący zespół otępienny, depresja oraz zaburzenia funkcji poznawczych (Fenoy i Simpson 2014). U chorych, u których zastosowanie DBS nie jest możliwe ze względu na przeciwwskazania neurochirurgiczne, spore nadzieje budzą terapie infuzyjne, pozwalające na utrzymanie stałego stężenia terapeutycznego leku w krwioobiegu, co umożliwia ciągłą stymulację dopaminergiczną w mózgu. Stosowane są podskórne wlewy agonisty receptorów dopaminergicznych - apomorfiny oraz dojelitowe wlewy L-dopy w postaci żelu, podawanej bezpośrednio do jelita poprzez zewnętrzny zgłębnik założony poprzez powłoki skórne brzucha (system Duodopa). Metody te są bardzo skuteczne w redukcji czasu „off” i zmniejszaniu liczby dyskinez (zwłaszcza system Duodopa) (Bogucki 2013). Ważny element terapii ChP stanowi rehabilitacja neurologiczna, która nie ogranicza się tylko do usprawnienia fizycznego, ale także obejmuje inne dziedziny

rehabilitacji tj. terapię zaburzeń mowy i połykania, problemy psychologiczne, zdolność do pracy i sprawy socjalno-bytowe (Kozak-Putowska i wsp. 2015).

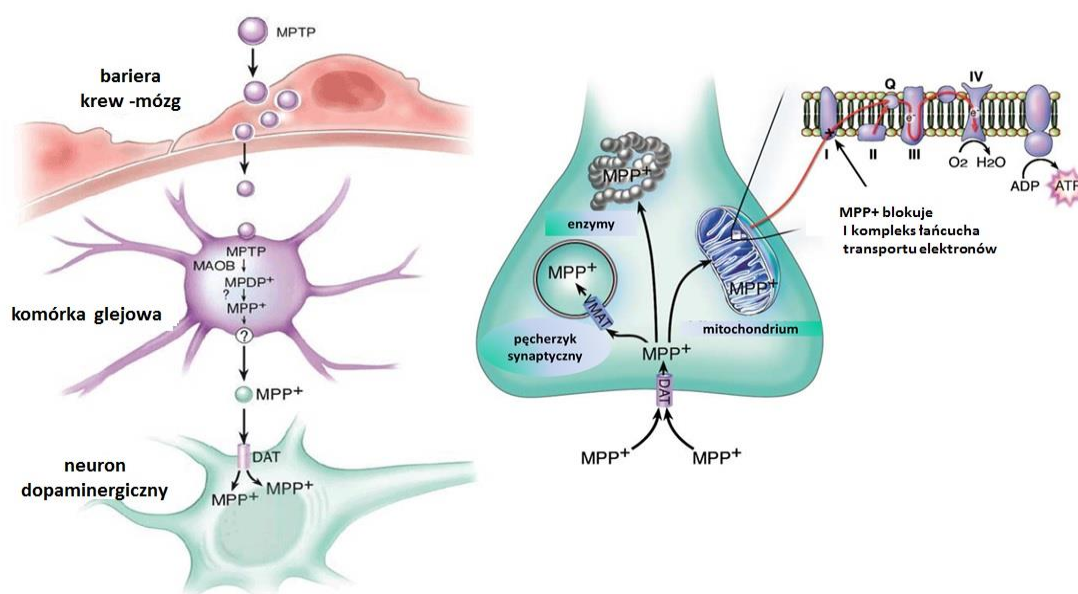
Mimo złożonej terapii ChP skuteczność leczenia choroby jest ograniczona przez stale postępującą utratę neuronów dopaminergicznych. Głównym wyzwaniem stojącym przed dzisiejszą nauką jest zatem poznanie przyczyn rozpoczynających proces degeneracji neuronów, określenie markerów wczesnego okresu schorzenia i stworzenie możliwości przyczynowego leczenia choroby poprzez wpływ na jej naturalny przebieg. Zasadne jest koncentrowanie farmakoterapii na związkach o działaniu neuroprotekcyjnym, dlatego ważnym kierunkiem badań podstawowych jest identyfikacja nowych mechanizmów molekularnych śmierci komórek, które kolejno pomogą w poszukiwaniu potencjalnych związków spowalniających ten proces.

Model neurotoksyczności MPTP/MPP+ w badaniach Choroby Parkinsona

Celem zrozumienia zmian w ChP na poziomie molekularnym, a tym samym opracowania terapii neuroprotekcyjnej prowadzone są badania w modelach komórkowych i zwierzęcych tej choroby. Jako złoty standard modelu ChP uznawana jest neurotoksyna środowiskowa 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna/1-metylo-4-fenylpirydyna (MPTP/MPP+). Toksyna MPTP/MPP+ wywołuje specyficzną i powtarzalną degenerację neuronów szlaku czarnoprążkowiowego u ludzi, małp i myszy, dlatego jest związkiem pierwszego wyboru dla badań nad mechanizmem śmierci komórek nerwowych w przebiegu ChP (Jackson-Lewis i wsp. 2012). Jako chemiczne czynniki modelowe ChP u zwierząt stosowane są również związki takie jak: 6-hydroksydopamina (6-OHDA), pestycydy (rotenon, parakwat) oraz czynniki prozapalne takie jak lipopolisacharyd (LPS). Model toksyczności MPTP stosowany u myszy i małp, oraz model 6-OHDA stosowany u szczurów, uznawane są za najlepiej odzwierciedlające zarówno ubytek neuronów szlaku czarnoprążkowiowego, jak i symptomy choroby (Blesa i Przedborski 2014). Charakterystykę neurotoksycznych właściwości MPTP wykonano w oparciu o badania autopsyjne mózgow 3 pacjentów, którzy zachorowali na ChP w wyniku zatrucia MPTP (Langston i wsp. 1999). W roku 1982 roku w grupie ok. 300. osób z północnej Kalifornii po zastosowaniu dożylnym preparatu syntetycznej heroiny - 1-metylo-4-fenyl-4-propionoamidoksy-

pirydyny (MPPP), analogu narkotyku meperydyny (Demerolu), pojawił się szybko postępujący zespół Parkinsona. Za neurotoksyczne właściwości odpowiedzialna była MPTP, która powstała jako produkt uboczny na drodze syntezy MPPP. Zatrucie wywołało nieodwracalne i ciężkie zaburzenia funkcji motorycznych, znamienne dla zespołu parkinsonowskiego, w tym drżenie, sztywność, spowolnienie ruchowe, niestabilność postawy i stany bezruchu. Pacjenci w początkowych stadiach choroby reagowali pozytywnie na leczenie L-dopą i bromokryptyną, jednak w wyniku długoterminowej terapii w obrazie klinicznym wystąpiły nieodwracalne dyskinezy, identyczne z obserwowanymi u pacjentów ze zdiagnozowaną ChP (Ballard i wsp. 1985; Langston i wsp. 1983). Czas przeżycia chorych wynosił od 3 do 16 lat. Badanie neuropatologiczne każdego pacjenta wykazało zanik pigmentowych komórek nerwowych w istocie czarnej (Langston i wsp. 1999). Wrażliwość na MPTP zależną od wieku i dawki wykazano także w badaniach na małpach i na myszach, skąd pochodzi większość obecnej wiedzy na temat tej toksyny. Udowodniono istotną korelację między zanikiem ciał komórek dopaminergicznych w obrębie części zbitej istoty czarnej (łac. *substantia nigra pars compacta*, SNpc), większą w stosunku do utraty neuronów pola brzusznej nakrywki (łac. *ventral tegmental area*, VTA), a stopniem zaburzenia czynności ruchowych u małp i myszy poddanych działaniu MPTP (Blesa i wsp. 2012; Seniuk i wsp. 1990; Jackson-Lewis i Przedborski 2007). W doświadczeniach na małpach, którym podawano małe dawki MPTP, wykazano preferencyjny zanik zakończeń neuronów dopaminergicznych w obrębie skorupy prążkowiej w stosunku do jądra ogoniastego (Snow i wsp. 2000; Moratalla i wsp. 1992). MPTP jako związek lipofilowy przenika barierę krew-mózg w ciągu kilku minut (Markey i wsp. 1984). Następnie z udziałem MAO-B w komórkach glejowych oraz neuronach serotonergicznym MPTP utleniana jest do 1-metylo-4-fenilo-2,3-dihydropirydyny (MPDP+). Kolejno MPDP+ prawdopodobnie na drodze spontanicznej oksydacji metabolizowana jest do jonu MPP+, który uwalniany jest do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (**Schemat 2.**). MPP+ wykazuje wysokie powinowactwo do transportera dopaminy (DAT) (Hare i wsp. 2013; Javitch i wsp. 1985). Badania *in vivo* dowodzą, że DAT jest niezbędny dla działania MPTP. Farmakologiczna inhibicja tego białka lub jego delecja chroni komórki dopaminergiczne przed degeneracją (Kitao i wsp. 2007; Javitch i wsp. 1985; Bezard i wsp. 1999). Jon MPP+ wewnątrz komórki nerwowej może przyjąć różne lokalizacje (**Schemat 2.**). MPP+ może wpływać na pęcherzykowy transporter monoamin (ang. vesicular monoamine transporter, VMAT2), który translokuje MPP+ do pęcherzyków synaptycznych. Komórki z nadekspresją VMAT2 mają zdolność sekwestracji MPP+ wewnątrz pęcherzyków

synaptycznych, co zmniejsza pulę toksyny dostępną dla mitochondriów i czyni komórki opornymi na działanie MPP⁺ (Chen i wsp. 2005). Nadekspresja VMAT2 zapobiega degradacji zakończeń neuronów dopaminergicznych w prążkowie myszy poddanych działaniu MPTP (Lohr i wsp. 2016). Myszy z podwójną homozygotyczną delecją VMAT2 są natomiast bardziej wrażliwe na neurotoksyczność MPTP (Takahashi i wsp. 1997). Kolejnym miejscem lokalizacji jonu MPP⁺ jest cytozol, gdzie może on wchodzić w interakcję z niektórymi enzymami, takimi jak dehydrogenaza aldehydowa (Klaidman i wsp. 1993). Lokalizacją odpowiedzialną za neurotoksyczne działanie MPP⁺ jest pierwszy kompleks łańcucha transportu elektronów w mitochondrium (**Schemat 2.**).



Schemat 2. Mechanizm działania MPTP/MPP⁺. Zmodyfikowano wg Dauer i Przedborski (2003).

objaśnienia skrótów: MPTP - 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna, MPDP⁺ - 1-metylo-4-fenilo-2,3-dihydropirydyna, MPP⁺ - 1-metylo-4-fenilopirydyna, MAO-B – monoaminooksydaza typu B, VMAT2 - pęcherzykowy transporter monoamin (ang. vesicular monoamine transporter), DAT – transporter dopaminy

MPP⁺ hamując aktywność NADH dehydrogenazy, prowadzi do zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, co wywołuje gwałtowne obniżenie poziomu adenosynotrójfosforanu (ATP) i zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT), które prowadzą do oksydacyjnego uszkodzenia białek i DNA (Nicklas i wsp. 1985; Henchcliffe i Beal 2008). MPP⁺ może indukować także stres oksydacyjny w mechanizmie uwalniania

DA z pęcherzyków synaptycznych (Johnson 1988). Dopamina, jako niezwykle reaktywna cząsteczka, wykazuje skłonność do łatwego utleniania i wytwarzania RFT (Meiser i wsp. 2013; Hattoria i wsp. 2009).

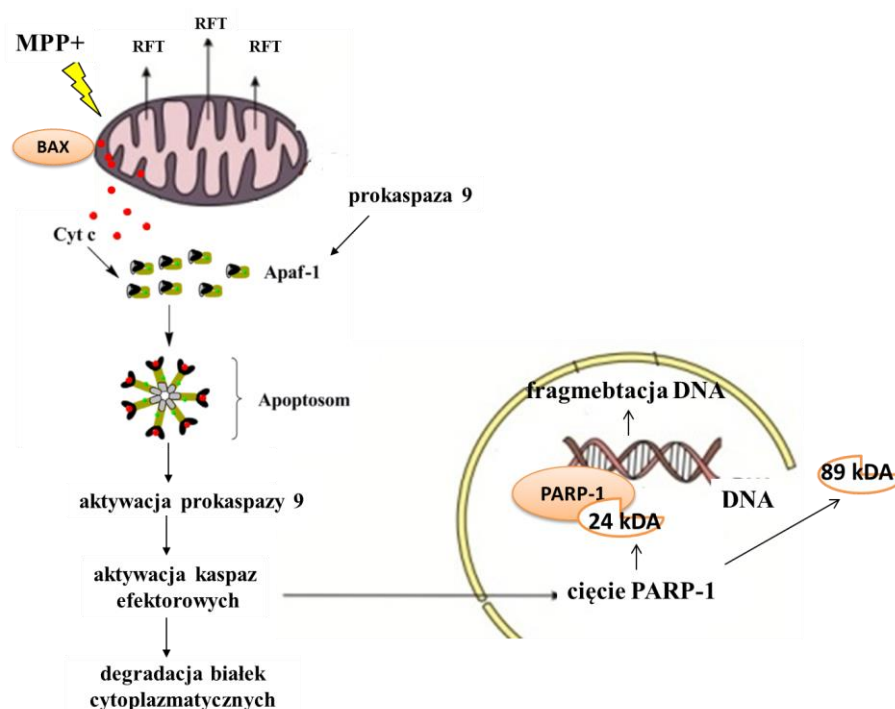
Komórki o fenotypie neuronalnym poddane działaniu MPP+ są powszechnie uznawanym modelem stresu oksydacyjnego, wykorzystywanym jednocześnie jako model zmian molekularnych obserwowanych w ChP (Xie i wsp. 2010; Khwanraj i wsp. 2015).

Molekularny mechanizm śmierci komórek w modelu MPTP/MPP+

Przez długi czas apoptoza uznawana była za główny mechanizm programowanej śmierci neuronów w przebiegu ChP. Badania w modelach *in vitro* i *in vivo* wykazały, że autofagia, pasywna oraz programowana nekroza, czy apoptoza niezależna od kaspaz, również mogą odpowiadać za śmierć komórek dopaminergicznych (Venderova i Park 2012). W modelach *in vivo* ChP w wymienionych warunkach stresowych komórka może umierać w wyniku kilku mechanizmów, zależnie od dawki toksyny, rejonu mózgu lub typu komórek oraz ich aktualnego stanu energetycznego (Venderova i Park 2012). MPP+ jako inhibitor I kompleksu łańcucha transportu elektronów i aktywator silnego stresu oksydacyjnego kieruje komórkę głównie na drogę wewnętrznego szlaku apoptozy, zależnej od dysfunkcji mitochondriów i proteolitycznych enzymów - kaspaz. Wysokie dawki MPP+ mogą prowadzić jednak do nekrotycznej śmierci komórki, co prawdopodobnie wiąże się z drastycznym obniżeniem poziomu ATP (Elmore 2007). Pierwsze doniesienia dotyczące programowanej śmierci komórki w modelu ChP pochodzą z badań *in vitro* z użyciem toksyny MPP+, w których wykazano znamienne dla apoptozy fragmentację DNA (Itano i Nomura 1995; Dipasquale i wsp. 1991). Badania *in vivo/in vitro* z użyciem toksyny MPTP/MPP+ wykazują charakterystyczne dla apoptozy zmiany na kilku jej etapach, ze szczególnym uwzględnieniem białek z rodziny Bcl-2, cytochromu c oraz enzymów proteolitycznych z grupy kaspaz. Białka Bcl-2 sklasyfikować można w trzy podrodziny. Pierwsza z nich to anty-apoptotyczne białka Bcl-2 zawierające cztery domeny BH (ang. Bcl-2 homology), których podstawową funkcją jest zachowanie integralności błony mitochondrialnej przez wiązanie pro-apoptotycznych białek z drugiej podrodziny Bax (trzy domeny BH), zwanych również białkami efektorowymi apoptozy. Białka należące do trzeciej podrodziny, zawierające wyłącznie domenę BH3 (ang. BH3-only” proteins), wypierają pro-apoptotyczne białka

typu Bax z kompleksów z białkami anty-apoptotycznymi. Ich ekspresja wzrasta w warunkach stresowych i ograniczona jest do określonego typu komórek. Przykładem białka BH3-only jest Harakiri (Hrk), którego ekspresja ograniczona jest do komórek nerwowych i aktywowana jest w odpowiedzi na brak neuronalnego czynnika wzrostu (NGF) (Ham i wsp. 2005). Wzrost ekspresji pro-apoptotycznego białka Bax z rodziny Bcl-2, a także wzrost stosunku Bax do anty-apoptotycznego białka Bcl-2 (Bax/Bcl-2), wykazano zarówno w komórkowych modelach MPP+, jak i w SN zwierząt poddanych działaniu MPTP (Hassouna i wsp. 1996; Khwanraj i wsp. 2015; You i wsp. 2016; Zhao i wsp. 2016). Jednocześnie podwójna homozygotyczna delecja białka Bax zmniejsza wrażliwość myszy na MPTP (Vila i wsp. 2001). Wysoką ekspresję białka Bax wykazano też w mózgach autopsyjnych pacjentów z ChP (Hartmann i wsp. 2001). Bax tworząc heterodimery z innymi białkami pro-apoptotycznymi formuje kanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej dla białek w niej zakotwiczonych m.in. cytochromu c. Wiele badań w modelu MPTP/MPP+ wykazało wzrost uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy (Cassarino i wsp. 1999; Liu i wsp. 2015; Wang i wsp. 2015; Chaudhuri i wsp. 2016). Cytochrom c w obecności ATP łączy się z białkiem Apaf-1 (ang. apoptotic protease activating factor-1), formując apoptosom (**Schemat 3.**). Odsłonięte domeny CARD (ang. caspase activation and recruitment domain) białek Apaf-1 są luźno związane z apoptosomem i mogą oddziaływać z domenami CARD prokaspazy-9, tworząc strukturę podobną do dysku. Aktywna inicjatorowa kaspaza-9 połączona z apoptosomem może aktywować wykonawczą prokaspazę-3 i prokaspazę-7, co prowadzi do proteolizy białek w komórce, a ostatecznie do jej śmierci (Green i Reed 1998; Marek 2013; Yuan i Akey 2013; Bratton i Salvesen 2010). Liczne badania wykazały, że MPP+ powoduje zależną od dawki i czasu inkubacji aktywację kaspazy-3 (Du i wsp. 1997; Kaul i wsp. 2003; Zheng i wsp. 2016). Hartmann i wsp. (2000) wykazali w analizie *post mortem* pacjentów z ChP korelację między stopniem utraty neuronów dopaminergicznych w śródmózgowiu a ekspresją tej egzekutorowej kaspazy. Ważny element szlaku apoptozy stanowi jądrowy enzym naprawczy DNA oraz regulator transkrypcji - polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP-1, EC.2.4.2.30), która katalizuje ADP-rybozylację m.in. białek histonowych oraz czynników transkrypcyjnych (tj. AP-1, AP-2, p53, NF-κB) (Krishnakumar i Kraus 2010; Pellegrino i Altmeyer 2016). W warunkach silnego stresu, wywołanego m.in. toksyną MPP+,

polimeraza PARP-1, która jest preferencyjnym substratem dla kaspazy-3, ulega proteolizie (Ye i wsp. 2015; Fan i wsp. 2015). Obecność fragmentów PARP-1 o ciężarze 89 kDa i 24 kDa jest biomarkerem aktywności proteolitycznej kaspazy-3 (Kaufmann i wsp. 1993; Chaitanya i wsp. 2010). Polimeraza PARP-1 może być też cięta *in vitro* przez kaspazę-7. Podczas gdy 89 kDa fragment uwalniany jest do cytoplazmy, fragment o ciężarze 24 kDa zawierający 2 palce cynkowe może trwale wiązać się z polimerazą PARP-1, hamując jej aktywność, a tym samym naprawę DNA (D'Amours i wsp. 2001) (**Schemat 3.**). Proces ten może odgrywać rolę w apoptozie komórek w przebiegu ChP, ChA, niedokrwienia oraz urazowego uszkodzenia mózgu (Kanthasamy i wsp. 2006; Peng i wsp. 2002; Lau i wsp. 2006; Chaitanya i Babu 2008).



Schemat 3. Mechanizm śmierci komórki w warunkach stresu wywołanego MPP+. Zmodyfikowano wg Marek (2013).

objaśnienia skrótów: MPP+ - 1-metylo-4-fenylopirydyna, BAX – białko pro-apoptotyczne z rodziny Bcl-2, Cyt c - cytochrom c, Apaf-1 – ang. apoptosis protease-activating factor 1, PARP-1 – polimeraza poli(ADP-rybozy), RFT – reaktywne formy tlenu

Kluczową rolę w mechanizmie śmierci komórek w warunkach toksyczności MPP+ odgrywa białko ASN. Badania Wu i wsp. (2009) wykazały, że obniżenie ekspresji

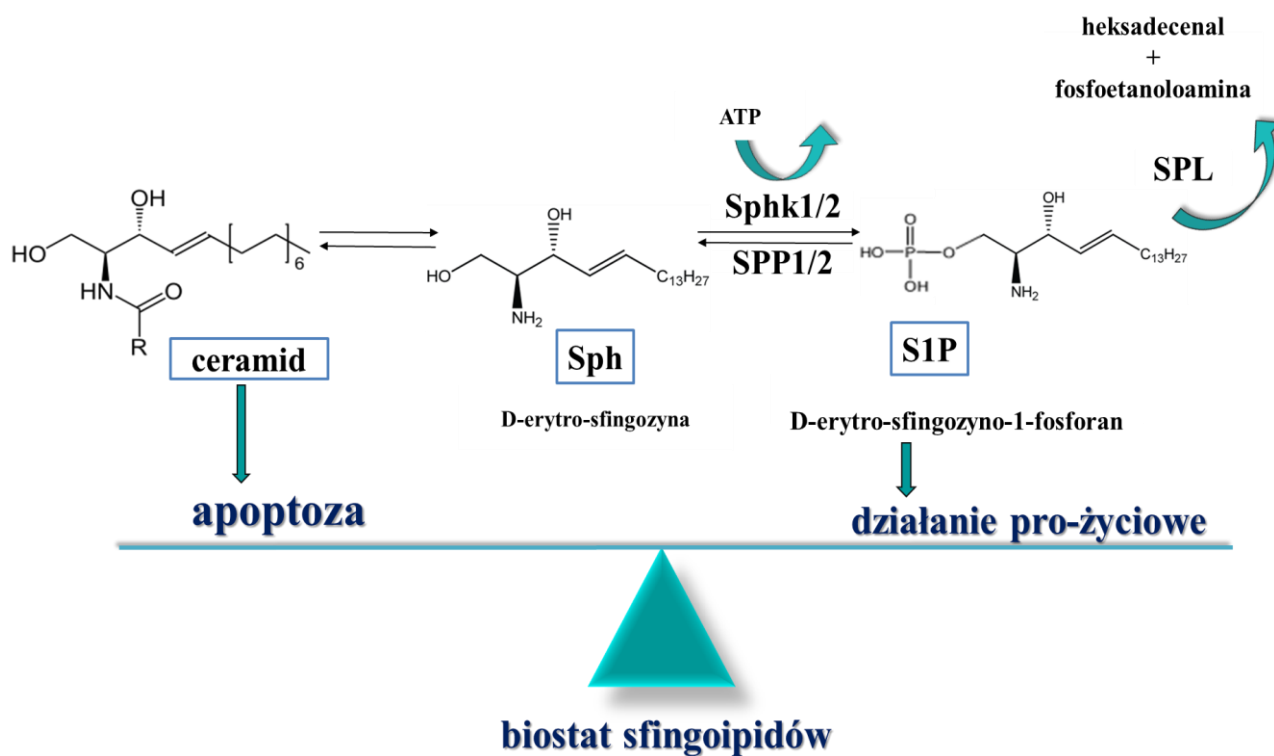
geny dla ASN w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+ znosi uwalnianie cytochromu c do cytoplazmy oraz wzrost ekspresji pro-apoptycznego białka Bax, co chroni komórki przed dysfunkcją mitochondriów i śmiercią. Ponadto nieletalne stężenie MPP+ powoduje uwalnianie ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zwiększając jej toksyczność i prowadząc do śmierci komórek SH-SY5Y (Pyszko i Strosznajder 2014b). Istnieje wiele dowodów *in vitro/in vivo* oraz badań *post mortem* pacjentów z ChP, które wskazują na śmierć komórek nerwowych na drodze klasycznej apoptozy, jednak żaden z jej etapów nie jest wykorzystywany jako punkt uchwytu w strategii terapeutycznej tej choroby. Udział aktywnych sfingolipidów (sfingozyno-1-fosforanu i ceramidu), które jako cząsteczki sygnalizacyjne również decydują o przeżyciu/śmierci komórki w patomechanizmie ChP, jest zagadnieniem niewyjaśnionym. Identyfikacja zachwiania homeostazy sfingolipidowej w modelu ChP może wskazać cenny kierunek strategii neuroprotekcijnej, co uzasadnia podjęcie przeze mnie tematu niniejszej rozprawy.

Kinazy sfingozyny (Sphk1 i Sphk2)

Znaczenie kinaz sfingozyny i sfingolipidów w fizjologii i patologii komórki

Żywo dyskutowanym tematem badań ostatniej dekady stało się zagadnienie udziału sfingolipidów w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, głównie ChA i stwardnienia rozsianego (*sclerosis multiplex*, SM) (Reed 2011; Couttas i wsp. 2014; Ceccom i wsp. 2014; Brinkmann i wsp. 2010). Sfingolipidy są zróżnicowaną pod względem budowy i funkcji rodziną lipidów błonowych. Najczęściej występującym w błonach komórkowych przedstawicielem sfingolipidów jest sfingomielina (Kishimoto i wsp. 2016). Cząsteczki sfingolipidów w wyniku samoorganizacji mogą tworzyć w błonach komórkowych mikrodomeny błonowe, zwane tratwami lipidowymi, które pełnią rolę w przekazywaniu sygnałów (Pacheco i wsp. 2016). Badania ostatnich 2 dekad wykazały, że niektóre sfingolipidy, tj. ceramid, sfingozyna (Sph) oraz sfingozyno-1-fosforan (ang. sphingosine-1-phosphate, S1P) biorą udział w transdukcji sygnału wewnątrz komórki, a także między komórkami, co stanowi dowód, że lipidy podobnie jak białka pełnić mogą istotną funkcję sygnalizacyjną (Pyne i wsp. 2016). Ceramid i sfingozyna są zaangażowane w szlaki obejmujące odpowiedź na stres komórkowy,

zatrzymanie cyklu komórki oraz jej programowaną śmierć (Cuvillier i wsp. 1996; Ogretmen i Hannun 2004). W przeciwieństwie do ceramidu i sfingozyny, S1P jest cząsteczką pro-życiową, która bierze udział w regulacji wzrostu, różnicowania, proliferacji komórek oraz hamowaniu procesu apoptozy (Spiegel i Milstien 2003; Pyne i Pyne 2002; Cuvillier i Levade 2001). Ze względu na przeciwstawne działanie powyższych sfingolipidów dynamiczna równowaga pomiędzy S1P a ceramidem, określana często jako „biostat sfingolipidów”, uznawana jest za istotny czynnik decydujący o przeżyciu/śmierci komórek (Spiegel i Milstien 2003). W szlaku metabolizmu sfingolipidów ceramid i S1P dzielą tylko 2 enzymatyczne reakcje. Pierwsza to deacetylacja ceramidu do sfingozyny, a druga to fosforylacja sfingozyny z udziałem kinaz sfingozyny (**Schemat 4.**).



Schemat 4. Udział Sphk1/2 w utrzymaniu biostatu między ceramidem a sfingozyno-1-fosforanem (schemat autorski).

objaśnienia skrótów: S1P – sfingozyno-1-fosforan, Sphk1/2 - kinazy sfingozyny 1 i 2, Sph – sfingozyna, SPP1/2 – fosfatazy S1P 1 i 2, SPL – liaza S1P

Istnienie szlaku metabolicznego, którego kolejne metabolity mają wyraźnie przeciwstawne działanie odpowiednio pro oraz anty-apoptotyczne (ceramid/S1P) sugeruje, że nawet niewielkie zaburzenie tej homeostazy może mieć fundamentalne znaczenie dla losu komórki. Liczne badania wskazują, że kluczowymi enzymami regulującymi homeostazę S1P/ceramid są kinazy sfingozyny (Sphk1/2) (EC:2.7.1.91) (Olivera i Spiegel 1993; Olivera i wsp. 2013; Pyne i wsp. 2016)

U ssaków sklonowano i scharakteryzowano dwie, odmienne pod względem budowy i właściwości biochemicznych izoformy Sphk: Sphk1 i Sphk2, które pełnią kluczową rolę w utrzymaniu biostatu sfingolipidów (Neubauer i Pitson 2013; Pyne i wsp. 2016). Enzymy te katalizują przeniesienie reszty fosforanowej z ATP do grupy 1-hydroksylowej osiemnastowęglowego, nienasyconego aminoalkoholu z jednym wiązaniem podwójnym - sfingozyny (Sph). Sphk1 i Sphk2 kodowane są przez 2 oddzielne geny, zlokalizowane odpowiednio na chromosomie 17 (17q25.2) i 19 (19q13.2). Podwójna homozygotyczna delecja obydwu izoform kinaz sfingozyny (*sphk1*^{-/-} *sphk2*^{-/-}) u myszy prowadzi do zaburzenia procesu angiogenezy oraz neurogenezy, w tym do niecałkowitego zamknięcia cewy nerwowej, a w ich konsekwencji do embrionalnej śmierci (Mizugishi i wsp. 2005). Myszy z delecją tylko jednej z izoform są fenotypowo prawidłowe, płodne i charakteryzują się podobną długością życia do myszy pozbawionych delecji (Mizugishi i wsp. 2005). U myszy (*sphk1*^{-/-}, *sphk2*^{+/+}) oraz (*sphk2*^{-/-}, *sphk1*^{+/+}) nie obserwuje się zmian w poziomie S1P w większości tkanek, poza surowicą, gdzie w przypadku delecji *sphk1* poziom S1P ulega obniżeniu do 50% wartości osiąganey u myszy typu dzikiego (Allende i wsp. 2004; Mizugishi i wsp. 2005). Sugeruje to istotną rolę pierwszej izoformy w syntezie surowiczej puli S1P. Sphk1 i Sphk2 mimo, że syntetyzują ten sam produkt, różnią się pod względem budowy, lokalizacji wewnątrzkomórkowej i właściwości biochemicznych.

Budowa kinaz sfingozyny

Sphk1 i Sphk2 po raz pierwszy sklonowano u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Nagiec i wsp. 1998). Te konserwatywne ewolucyjnie enzymy wykazują znaczną homologię w sekwencji aminokwasów u drożdży, nicieni (*C. elegans*), myszy i innych ssaków, także u człowieka. Sphk1 i Sphk2 nie wykazują jednak podobieństwa pod względem sekwencji i struktury przestrzennej do innych znanych białek. Pewną

homologię sekwencji stwierdzono jedynie z kinazą diacyloglicerolu w obrębie domeny katalitycznej (Kohama i wsp. 1998; Leclercq i Pitson 2006). Sphk1 i Sphk2 zawierają pięć konserwowanych domen (C1-C5), przy czym domeny katalityczne lokalizują się w rejonie C1-C3, a domena wiązania ATP w regionie C2 (Pitson i wsp. 2002). Sphk1 pozbawiona jest hydrofobowych transbłonowych sekwencji, które w liczbie czterech obecne są w izoformie drugiej. Pomimo istotnej homologii tych dwóch białek (sekwencja Sphk1 w 45% jest identyczna z Sphk2, a w 80% wykazuje podobieństwo) stwierdzono niewielkie różnice strukturalne determinujące odmienną lokalizację wewnątrzkomórkową, specyficzność substratową oraz regulację aktywności obydwu enzymów (Liu i wsp. 2000; Neubauer i Pitson 2013; Santos i Lynch 2015). Sphk1 jest białkiem o niższej masie cząsteczkowej aniżeli Sphk2. Poznane i scharakteryzowane zostały 2 warianty Sphk1, powstałe w wyniku alternatywnego składania prekursorowego mRNA: SK1a, zawierający 384 reszty aminokwasowe oraz SK1b, wzbogacony o dodatkową sekwencję 86-aminokwasów N-końca, która prawdopodobnie odpowiada za większą stabilność i mniejszą wrażliwość na degradację proteasomalną (Pyne i wsp. 2016). Wzrost poliubikwitynacji, degradacji SK1a w proteasomie oraz jednoczesną oporność SK1b zaobserwowano w komórkach nowotworu prostaty niewrażliwych na androgeny i równocześnie poddanych działaniu inhibitora, czyli 2-(p-hydroksyanilino)-4-(p-chlorofenylo)tiazolu (SKI II), który uznawany jest jako preferencyjny inhibitor Sphk1, dodatkowo stymulujący jej degradację proteasomalną (Lim i wsp. 2012). Działanie powyższego inhibitora na SK1a i SK1b jest jednak zależne od typu komórek. W komórkach nowotworu prostaty wrażliwych na androgeny dochodzi do degradacji zarówno SK1a, jak i SK1b, a także zmiany równowagi S1P/ceramid na korzyść proapoptotycznego ceramidu i śmierci komórki (Loveridge i wsp. 2010). Poznano także 2 warianty Sphk2: SK2a (654 reszty aminokwasowe) oraz zawierający dodatkową 36-aminokwasową sekwencję N-końcową SK2b, która prawdopodobnie odpowiedzialna jest za większe spektrum substratowe i aktywność katalityczną enzymu (Pitson 2011; Billich i wsp. 2003). Zasadnicza różnica strukturalna między Sphk1 a Sphk2 polega na dłuższej sekwencji N-końcowej Sphk2, gdzie znajduje się sekwencja lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization sequence, NLS). Ponadto centralna domena Sphk2 jest bogata w reszty proliny, niezidentyfikowane w Sphk1, gdzie zlokalizowana jest sekwencja odpowiedzialna za eksport Sphk2 z jądra do cytoplazmy (ang. nuclear export sequence,

NES) (Neubauer i Pitson 2013). Fragment ten odpowiadać może także za większą aktywność katalityczną względem tych samych substratów. Przekładem może być fosforylacja fingolimodu, analogu sfingozyny i zarazem leku immunosupresyjnego w SM, która zachodzi z 30-krotnie większą aktywnością w przypadku Sphk2 niż Sphk1 (Billich i wsp. 2003).

Specyficzność substratowa kinaz sfingozyny

Zarówno Sphk1, jak i Sphk2 mają zdolność wiązania D-erytro-sfingozyny i D-erytro-dihydrosfingozyny w miejscu katalitycznym, a w efekcie syntezy odpowiednio S1P i dihydro-S1P, jednak z różną kinetyką reakcji. Naturalnie występująca w komórce D-erytro-sfingozyna jest preferencyjnym substratem Sphk1, natomiast D-erytro-dihydrosfingozyna jest fosforylowana z większą wydajnością przez Sphk2. Sphk2 w przeciwieństwie do Sphk1 może także fosforylować inne substraty lipidowe tj. fitosfingozynę, a także inhibitor Sphk1 - D, L-treo-dihydrosfingozynę (Liu i wsp. 2000). Sphk2 jest odpowiedzialna także za fosforylację fingolimodu (FTY720), który jest analogiem sfingozyny i pierwszym doustnym lekiem immunosupresyjnym w SM. W warunkach *in vitro* zdolność fosforylacji FTY720 ma także Sphk1, lecz Sphk2 przeprowadza tą reakcję z dużo większą wydajnością (Billich i wsp. 2003; Paugh i wsp. 2003; Sanchez i wsp. 2003). Myszy z delecją Sphk2 (*sphk2*^{-/-}) tylko w niewielkim stopniu syntetyzują ufosforylowany fingolimod (FTY720-P) (Kharel i wsp. 2005). Jak wspomniano powyżej, szersze spektrum substratowe Sphk2 wynikać może z obecności centralnej domeny bogatej w reszty proliny, chociaż funkcjonalne znaczenie tych dodatkowych sekwencji nie jest w pełni poznane. Różnice w zdolności poszczególnych substratów do aktywacji i hamowania Sphk1 i Sphk2 wykorzystywane są w optymalizacji warunków badania aktywności poszczególnych izoform Sphk. Niejonowy detergent, eter polimeru glikolu polietylenowego - Triton X-100 hamuje Sphk2 i zwiększa aktywność Sphk1. W przeciwieństwie do powyższego związku, wysokie stężenia soli nieorganicznych mają hamujący efekt na Sphk1, a istotnie stymulują aktywność Sphk2, co wykorzystywane jest w formułowaniu składu buforów inkubacyjnych do oznaczania aktywności poszczególnych lizoform kinaz sfingozyny (Don i wsp. 2007).

Lokalizacja wewnątrzkomórkowa i rozmieszczenie tkankowe kinaz sfingozyny

Ekspresja obydwu izoform Sphk, jak i stężenie S1P jest szczególnie wysokie podczas rozwoju embrionalnego. U myszy najwyższy poziom ekspresji Sphk1 obserwowany jest wcześniej (E7-E11) niż Sphk2 (E15-E17) (Liu i wsp. 2000). Sphk1 występuje głównie w cytoplazmie i siateczce śródplazmatycznej (ang. endoplasmic reticulum, ER), a także może być związana z błoną komórkową, do której translokuje się jako forma aktywna (Pitson 2003). Sphk1 w głównej mierze odpowiada za syntezę puli S1P, transportowanej poza komórkę i działającej w sposób auto i parakryny za pośrednictwem receptorów dla S1P. Sphk2, w zależności od typu komórek, może występować w ER, w jądrze komórkowym i mitochondriach. Sphk2 w odróżnieniu od Sphk1 posiada w swej strukturze sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS) oraz sekwencję odpowiedzialną za eksport Sphk2 z jądra do cytoplazmy (NES) (Neubauer i Pitson 2013). Obydwie izoformy występują we wszystkich tkankach ludzkich, jednak Sphk1 osiąga najwyższą ekspresję w płucach, śledzionie i limfocytach (Melendez i wsp. 2000), natomiast Sphk2 najliczniej występuje w wątrobie i nerkach (Liu i wsp. 2000). Wysoki poziom ekspresji Sphk1, która uznawana jest za onkogen, a tym samym wysokie stężenie S1P, występuje w komórkach nowotworowych żołądka, płuc, mózgu, okrężnicy, nerek, piersi i chłonnaika nieziarniczego (Pyne i wsp. 2014; Pyne i Pyne 2010). Wysoka ekspresja Sphk1 w guzach litych, w tym nowotworach piersi, jest związana z opornością na Tamoxifen i ze złym rokowaniem klinicznym dla pacjentów (Watson i wsp. 2010).

Regulacja aktywności kinaz sfingozyny

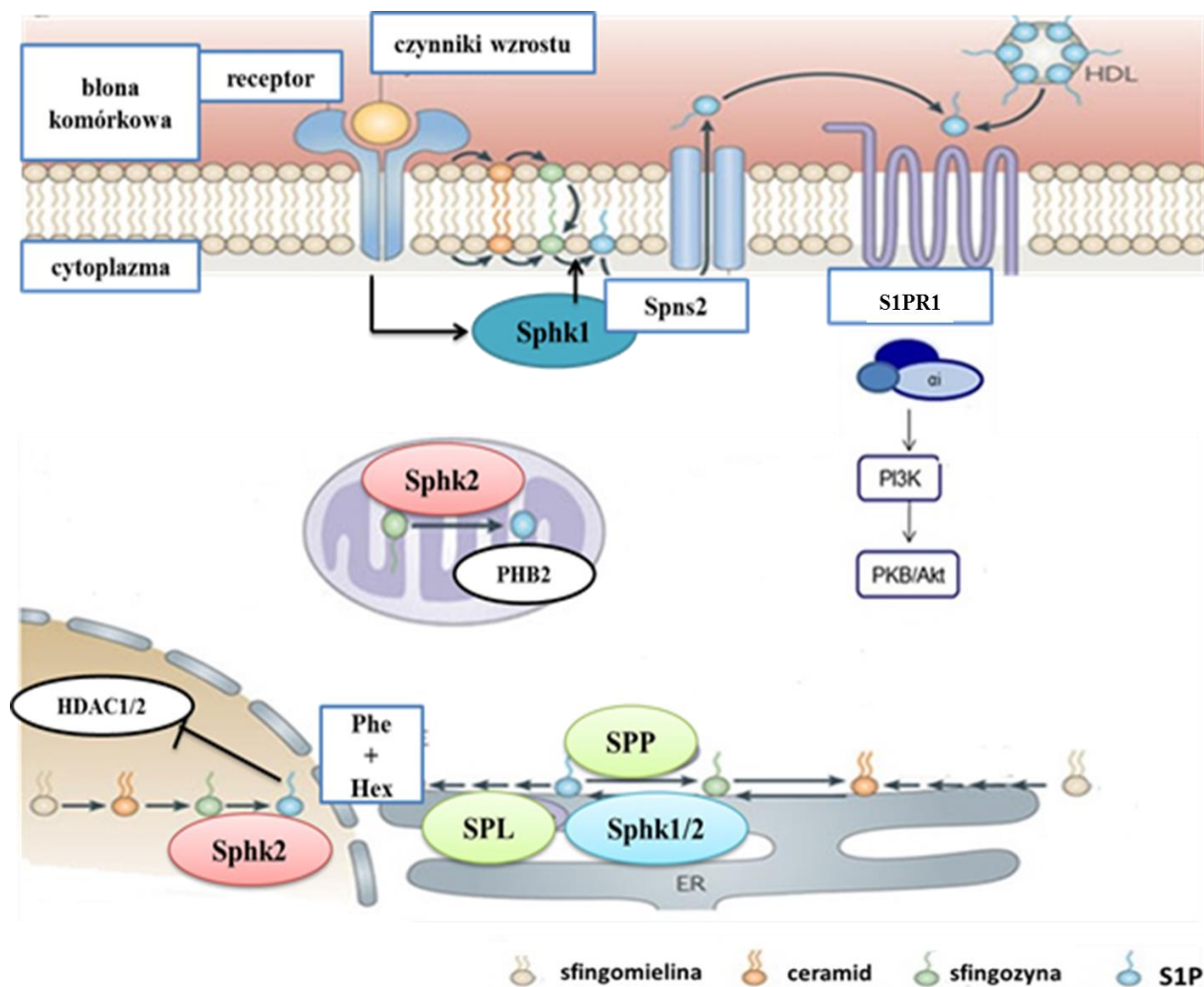
Liczne czynniki wzrostu, w tym NGF (Edsall i wsp. 1997; 2001) oraz płytkowopochodny czynnik wzrostu (PDGF) (Meyer Heringdorf 1998), estry forbolu (Buehrer i wsp. 1996), witamina D3 (Kleuser i wsp. 1998), agoniści receptorów muskarynowych, czynnik martwicy nowotworów (TNF- α) (Kimura i wsp. 1999) i inne cytokiny powodują wzrost aktywności Sphk1. W mechanizmie aktywacji Sphk1 kluczową rolę pełnią: kinaza białkowa C (PKC) (Buehrer i wsp. 1996), kinaza białkowa A (Machwate i wsp. 1998), a przede wszystkim kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK1/2), która fosforyluje Sphk1 na Ser 225, prowadząc do 14-krotnego wzrost jej aktywności (Pitson 2003). Sphk1 w wyniku fosforylacji ulega

translokacji do błony komórkowej, gdzie znajduje się sfingozyna (Sph), stanowiąca substrat dla syntezy S1P (Pitson 2003). Innym mechanizmem translokacji Sphk1 do błony komórkowej jest bezpośrednia interakcja z białkiem wiążącym wapń i integrynę 1 (CIB1), z którym Sphk1 łączy się w sekwencji wiążącej kalmodulinę (Jarman i wsp. 2010). Aktywność Sphk2 podobnie jak Sphk1 wzrasta pod wpływem m.in. czynników wzrostu, estrów forbolu (Hait i wsp. 2005), TNF- α , interleukin (IL-1 β) (Mastrirea i wsp. 2005), a także jest zależna od fosforylacji z udziałem kinazy ERK1/2, która zwiększa jej aktywność od 2 do 6 razy (Hait i wsp. 2005). Zidentyfikowano 2 miejsca fosforylacji dla kinazy ERK1/2 na Ser 351 i na Thr 578 w przypadku SK2a oraz Ser 387 i Thr 614 w przypadku SK2b. Istotna dla funkcji Sphk2 jest modyfikacja post-translacyjna, tj. fosforylacja z udziałem kinazy białkowej D na Ser 419 i Ser 421 w rejonie NES, która promuje eksport Sphk2 z jądra komórkowego (Ding i wsp. 2007).

Sfingozyno-1-fosforan

Metabolizm i mechanizm działania sfingozyno-1-fosforanu

S1P powstaje w komórce w wyniku fosforylacji sfingozyny przez dwie omówione powyżej kinazy. Sfingozyna jest produktem końcowym hydrolizy ceramidów. Ceramidy syntetyzowane są „*de novo*” lub uwalniane w wyniku hydrolizy wyższych sfingolipidów błonowych, głównie glikosfingolipidów oraz sfingomieliny. Pomimo, że proces ten zachodzi w wielu kompartmentach komórkowych, m.in. w błonie komórkowej, większość sfingozyny powstaje w lizosomach (Proia i Hla 2015). Synteza S1P, zależnie od lokalizacji poszczególnych izoform Sphk1/2, zachodzi w kilku miejscach w komórce. Sphk1 występuje w cytoplazmie i ER. Enzym ten w wyniku fosforylacji ulega translokacji do błony komórkowej i syntetyzuje pulę S1P, która uwalniana jest na zewnątrz komórki (**Schemat 5**).



Schemat 5. Metabolizm i mechanizm działania S1P. Zmodyfikowano wg Spiegel i Milstien (2011).

objaśnienia skrótów: S1P – sfingozyno-1-fosforan, Sphk1 – kinazy sfingozyny 1, Sphk2 – kinazy sfingozyny 2, Sph – sfingozyna, SPP1/2 – fosfatazy S1P 1 i 2, SPL – liaza S1P, Spns2 – białko spinster 2, transporter S1P, S1PR1 – pierwszy receptor S1P, Phe – fosfoetanolamina, Hex – heksadecenal, HDAC1/2 – deacetylazy histonowe 1/2, HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości, PKB/Akt – kinaza białkowa B, PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, PHB2 – prohibityna druga

Proces ten zachodzi z dużą wydajnością w erytrocytach, płytkach krwi a także w komórkach śródbłona naczyń (Venkataraman i wsp. 2008; Pappu i wsp. 2007; Hisano i wsp. 2012). Transport z zewnętrznej błony komórkowej jest aktywny i odbywa się za pomocą białek transportowych. Do białek tych należy białko Spinster 2 (Spns2), które jest członkiem super-rodziny transporterów błonowych (ang. major facilitator superfamily, MFS) oraz białka transportowe, posiadających kasetę wiążącą ATP

(ang. ATP-binding cassette transporters) tj. ABC1, ABCG2, ABCA1. Spns2 jest swoistym dla S1P transporterem, który uczestniczy m.in. w sekrecji S1P z komórek śródbłonka naczyń do krwi (Fukuhara i wsp. 2012). Proces uwalniania S1P z płytek krwi do osocza zachodzi pod wpływem sił rozciągania (ang. shear stress), a także po stymulacji trombiną i jest ściśle związany z aktywnością PKC (Sałata i wsp. 2012; Jonnalagadda i wsp. 2014). Zdolność uwalniania S1P mają ponadto neutrofile, komórki śródbłonka naczyń i erytrocyty (Ancellin i wsp. 2002). S1P, który wydostaje się poza komórkę może działać zarówno na tę samą komórkę, jak również na komórki sąsiadujące w sposób auto i parakryny, za pośrednictwem swoistych receptorów związanych z białkami G, nazwanymi S1PR1-5. S1P działać może także jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik drugiego rzędu.

Wewnątrzkomórkowa pula S1P syntetyzowana jest w znacznej mierze przez Sphk2, która zlokalizowana jest głównie w jądrze komórkowym i mitochondriach (**Schemat 5.**). Odpowiada ona za powstawanie puli S1P, odpowiedzialnej za regulację transkrypcji i funkcji mitochondriów. Sphk2, obecna w jądrze komórkowym wchodzi w skład kompleksu represorowego w sekwencji promotora genów kodujących cyklinozależny inhibitor kinaz - białko p-21 i czynnik transkrypcyjny c-fos. W wyniku aktywacji kinazy PKC, np. przez estry forbolu następuje fosforylacja i zwiększona aktywność katalityczna Sphk2, która syntetyzuje S1P. W ciągu kilku minut poziom tego aktywnego sfingolipidu zwiększa się kilkukrotnie, czemu towarzyszy szybka kolokalizacja Sphk2 i deacetylaz histonowych (HDAC1/2). Powstały S1P specyficznie wiąże się z HDAC1 i HDAC2, hamując ich aktywność enzymatyczną (Hait i wsp. 2009). Powoduje to uwolnienie kompleksu represorowego z promotora i umożliwia proces transkrypcji genów białek, takich jak p-21. Białko p21 jest silnym inhibitorem kinaz zależnych od cyklin (ang. cyclin dependent kinases, CDK). Wiąże się ono z kompleksami CDK2 i CDK4, hamując ich aktywność i tym samym działa jako regulator cyklu komórkowego w fazie G1 (Wade Harper i wsp. 1993).

S1P, produkowany przez mitochondrialną Sphk2, wiąże się z dużym powinowactwem i specyficznością do prohibityny drugiej (ang. prohibitin 2, PHB2) (Strub i wsp. 2011). PHB2 jest wysoce konserwowanym białkiem zlokalizowanym głównie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i pełni istotną rolę w zachowaniu struktury IV kompleksu łańcucha transportu elektronów (oksydazy cytochromu c)

i fosforylacji oksydacyjnej (Artal-Sanz i Tavernarakis 2009). W przeciwieństwie do PHB2, S1P nie wiąże się z białkiem PHB1, które z PHB2 tworzy duże, multimeryczne kompleksy. W mitochondriach myszy z podwójną homozygotyczną delecją *sphk2*^{-/-} wykryto, że interakcja oksydazy cytochromu c z białkiem PHB2 została wyraźnie zmniejszona. Jednocześnie delecja genu *sphk2*^{-/-} prowadzi do zaburzenia procesu fosforylacji oksydacyjnej. Dane te wskazują, że interakcja S1P z PHB2 jest istotna dla zachowania funkcji mitochondriów.

Kolejnym istotnym białkiem efektorowym S1P jest TRAF2 (czynnik związanym z receptorem dla TNF- α). Białko TRAF2 jest kluczowym regulatorem zależnej od TNF- α aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (czynnika jądrowego kappa B, ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), który odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, zapalnej i anty-apoptotycznej. Białko TRAF2 łączy się z Sphk1, zlokalizowaną w pobliżu wewnętrznej błony komórkowej i zwiększa jej aktywność. Powstały wówczas S1P łączy się z N-końcową domeną RING na białku TRAF2 (Alvarez i wsp. 2010). W wyniku kolejnych zjawisk molekularnych dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B.

Jak wspomniano, S1P jest wysoce reaktywną cząsteczką lipidową, której stężenie jest wyrazem równowagi między aktywnością enzymów odpowiedzialnych za jej syntezę i degradację (Olivera i Spiegel 1993). S1P może ulegać przekształceniu do ceramidu, który stanowi substrat syntezy wyższych sfingolipidów. W pierwszym etapie S1P ulega defosforylacji do sfingozyny z udziałem specyficznych dla S1P fosfataz: SPP1 oraz SPP2 (Le Stunff i wsp. 2007; Ogawa i wsp. 2003) (**Schemat 5.**). Obie fosfatazy należą do podrodziny fosfataz lipidowych i zlokalizowane są w ER, która jest jednocześnie miejscem lokalizacji enzymów syntezy ceramidów. SPP1 i SPP2 biorą zatem udział w regulacji równowagi S1P/ ceramid (Johnson i wsp. 2003). Kolejno, ceramidy mogą być metabolizowane do wyższych sfingolipidów (Schulze i Sandhoff 2014). Zmiany w metabolizmie wyższych sfingolipidów, głównie zaburzenie ich hydrolizy, prowadzić mogą do licznych lizosomalnych chorób spichrzeniowych, zwanych sfingolipidozami (Platt 2014). S1P może ulegać również nieodwracalnej degradacji do fosforanu etanoloaminy i heksadecenal (**Schemat 5.**). Reakcja ta zachodzi w ER z udziałem liazy S1P (SPL). Produkty degradacji mogą być następnie kierowane na szlak syntezy sfingolipidów. Heksadecenal jest metabolizowany przez dehydrogenazę aldehydów

tłuszczowych do heksadekanianu, który jest prekursorem palmitoilo-CoA. Fosfoetanolamina natomiast służy do syntezy fosfatydyloetanolaminy, która wraz z palmitoilo-CoA stanowi substrat syntezy ceramidu *de novo* (Stiban i wsp. 2010).

Sfingozyno-1-fosforan w płynach ustrojowych

Stężenie S1P w surowicy (~ 1 μM) i układzie limfatycznym (~ 100 nM) może być nawet 100-1000 razy wyższe w stosunku do płynu śródmiąższowego tkanek (Olivera i wsp. 2013; Schwab i wsp. 2005). Utrzymanie takiego gradientu stężeń ma istotne znaczenie dla biologicznej funkcji zewnątrzkomórkowej puli tego lipidu. Wysokie stężenie S1P w układzie krążenia wynika z jego wysokiego poziomu w erytrocytach i komórkach śródbłonna, które metabolicznie ukierunkowane są na jego uwalnianie. S1P uwalniany z erytrocytów stanowi niemal całkowitą pulę S1P w surowicy na etapie rozwoju embrionalnego oraz około 75% w przypadku dojrzałego organizmu. Pozostała pula pochodzi z komórek śródbłonna naczyń (Pappu i wsp. 2007; Xiong i wsp. 2014). W warunkach fizjologicznych płytki krwi nie wykazują ekspresji liazy S1P i określane są mianem magazynu S1P. Podczas ich aktywacji może dochodzić do uwalniania S1P i lokalnego wzrostu stężenia tego aktywnego sfingolipidu. W przypadku limfy głównym źródłem S1P są komórki śródbłonna limfatycznego (Pham i wsp. 2010). Znakomita większość surowiczej puli S1P występuje w postaci związanej z lipoproteinami HDL, VLDL i HDL (~65%) i albuminą (~35%) (Argraves i Argraves 2007). Tylko niewielki ułamek procenta puli S1P występuje w postaci wolnej. Z lipoproteinami S1P wiąże się za pośrednictwem apolipoproteiny ApoM, działającej jako białko opiekuńcze, które kontroluje poziom S1P we krwi, ułatwia jego rozpuszczenie w środowisku wodnym oraz transport w krwioobiegu. Ponadto ApoM chroni cząsteczkę tego aktywnego lipidu przed degradacją i bierze udział w jej prezentacji i interakcji ze specyficznymi receptorami dla S1P (Christoffersen i wsp. 2011).

Receptory dla sfingozyno-1-fosforanu

Istnieje pięć błonowych receptorów S1P sprzężonych z białkami G, określanymi mianem S1PR1–S1PR5 (Pyne i Pyne 2002; Kluk i Hla 2002; Takabe i wsp. 2008). Receptory S1P posiadają siedem transbłonowych domen i wykazują około 50% identyczności sekwencji aminokwasowej. Głównym ligandem jest dla nich S1P oraz

wykazujący mniejsze powinowactwo dihydro-S1P (Pyne i Pyne 2002; Taha i wsp. 2004). Zależna od pobudzenia powyższych receptorów odpowiedź komórki jest istotna przede wszystkim w rozwoju układów krwionośnego, odpornościowego oraz nerwowego. W dojrzałym organizmie S1PR1-5 biorą udział w utrzymaniu integralności bariery naczyniowej, regulują napięcie naczyń oraz recyrkulację limfocytów. Receptory S1P i zależny od nich szlak przekąźnictwa mogą mieć znaczenie w przebiegu chorób autoimmunologicznych, chorób o podłożu zapalnym i nowotworowym (Blaho i Hla 2014). Agoniści receptorów S1P oraz jego analogi mogą mieć istotne znaczenie terapeutyczne. Najlepszym przykładem jest wykorzystanie analogu sfingozyny - fingolimodu (FTY720, nazwa handlowa Gilenya™) jako pierwszego doustnego leku immunosupresyjnego w terapii SM. Każdy z receptorów sprzężony jest z określonym typem białek G, które kolejno aktywują szlaki przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego. Zależna od pobudzenia poszczególnych receptorów odpowiedź komórki może być często przeciwstawna (Kihara i wsp. 2014).

Receptor pierwszy S1PR1 charakteryzuje wysoka ekspresja w większości tkanek organizmu. Receptor ten, związany z białkiem G α i, hamuje aktywność cykazy adenylanowej i przekąźnictwo związane z cAMP, aktywuje białko Ras, które stymuluje serynowo-treoninową kinazę Raf, a następnie kaskadę kinaz aktywowanych mitogenami (ang. mitogen activated protein kinases, MAPK). S1PR1 pośredniczy w przekazywaniu sygnałów związanych z procesami proliferacji, różnicowania i transformacji nowotworowej (Walker i wsp. 2013; Koul i wsp. 2013). Delecja *s1p1*^{-/-} powoduje podobne zmiany jak delecja *sphk1*^{-/-} i *sphk2*^{-/-}. Zarodki mysie nie przeżywają na skutek wewnętrznych krwotoków, spowodowanych zaburzeniem procesu angiogenezy (Mizugishi i wsp. 2005). W układzie krążenia S1PR1 zaangażowany jest bowiem w proces kontroli dojrzewania i migracji komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Ważną rolą S1PR1 zlokalizowanego w komórkach śródbłonka naczyń jest utrzymanie bariery i napięcia ścian naczyń krwionośnych. S1PR1 występuje w mikrodomenach bogatych w kaweolinę (ang. caveolin-enriched microdomains, CEMs), pobudza prożyciową kinazę Akt, która aktywuje białko Rac, co powoduje reorganizację aktyny i utrzymanie bariery naczyń (Singleton i wsp. 2009). S1PR1 obecny na powierzchni limfocytów T odpowiada za ich ukierunkowaną migrację z tkanki limfatycznej do chłonki i krwi (Schwab i wsp. 2005). Internalizacja tego receptora hamuje proces recyrkulacji

limfocytów (Brinkmann i wsp. 2004). S1PR1 jest również obecny w komórkach nerwowych.

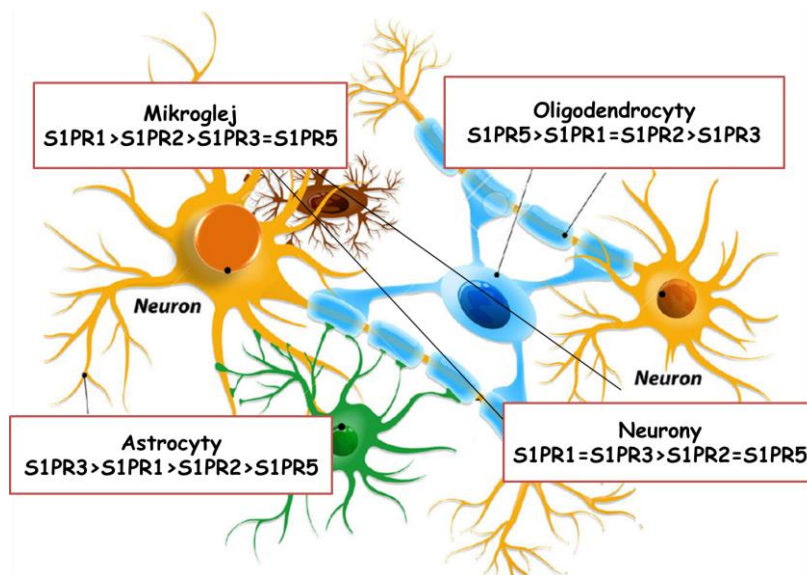
Receptory S1PR2 oraz S1PR3 są obecne w sercu płucach i mózgu, a S1PR3 także w nerkach, śledzionie i trzustce (Sanchez i Hla 2004). Obydwa receptory są sprzężone z białkami G α i, G α q, oraz G12/13 i mogą wywierać różne efekty biologiczne (Means i wsp. 2007). S1PR2 powoduje zależną od G12/13 aktywację białka Rho, które hamuje białko Rac i tym samym hamuje migrację komórek (Sugimoto i wsp. 2003). Wywiera zatem efekt antagonistyczny w stosunku do S1PR1, który aktywuje zależną od Rac migrację. Udowodniono także przeciwstawny efekt receptorów S1PR2 i S1PR3 na kinazę Akt i receptor dla PDGF. S1PR3 w mysich fibroblastach jest niezbędny dla aktywacji pro-życiowej kinazy Akt. Ponadto antagonistą receptora PDGF znosi zależną od S1P aktywację kinazy Akt. (Baudhuin i wsp. 2004). Z drugiej strony S1PR2 negatywnie reguluje zależną od receptora PDGF migrację i proliferację mysich fibroblastów (Goparaju i wsp. 2005). Myszy z delecją receptorów S1PR2 i S1PR3 (*s1p2^{-/-}* i *s1p3^{-/-}*) są żywotne i fenotypowo normalne, jednak charakteryzują się znacząco niższą liczbą miotów. Niektóre szczepy pozbawione ekspresji S1PR2 wykazują spontaniczne epizody padaczkowe, a także zaburzenia narządu słuchu i równowagi oraz napięcia naczyń krwionośnych (Akahoshi i wsp. 2011; MacLennan i wsp. 2006). Podwójna homozygotyczna delecja *s1p1^{-/-}* i *s1p2^{-/-}* pogłębia obszar objęty krwotokiem oraz przyspiesza śmierć embrionalną myszy. Zjawiska te ulegają spotęgowaniu w przypadku delecji trzech receptorów *s1p1^{-/-}*, *s1p2^{-/-}* i *s1p3^{-/-}*, co sugeruje wzajemną zależność receptorów (Kono i wsp. 2004).

Występowanie S1PR4 i S1PR5, w odróżnieniu od pozostałych receptorów, ograniczone jest do określonego typu komórek. Receptory te sprzężone są z białkami G α i oraz G12/13 (Gräler i wsp. 2003). S1PR4 występuje w komórkach układu limfatycznego i hematopoetycznego (Gräler i wsp. 1998; Rivera i wsp. 2008). Receptor ten, pierwotnie sklonowany z ludzkich i mysich komórek dendrytycznych, wiąże S1P ze 150 krotnie mniejszą siłą niż pozostałe receptory. Myszy z podwójną homozygotyczną delecją *s1p4^{-/-}* wykazują normalną liczbę limfocytów obwodowych i regularną budowę układu limfatycznego. S1PR4 tylko nieznacznie wpływa na funkcje limfocytów T *in vivo*. Migracja komórek dendrytycznych i sekrecja cytokin ulegają jednak wyraźnemu zaburzeniu. Brak ekspresji S1PR4 znacznie zmniejsza różnicowanie subpopulacji

limfocytów Th17 (Schulze i wsp. 2011). S1PR5 wykazuje najwyższą ekspresję w oligodendrocytach istoty białej. Występuje on także w skórze, śledzionie i komórkach układu odpornościowego (głównie komórkach NK) (Blaho i Hla 2014). Myszy z podwójną homozygotyczną delecją *s1p5*^{-/-} mają prawidłowy fenotyp, jednak wykazują nieprawidłową migrację oligodendrocytów, zmniejszoną liczbę komórek NK na obwodzie i zwiększoną w węzłach chłonnych (Mayol i wsp. 2011).

Rola sfingozyno-1-fosforanu w układzie nerwowym

Receptory S1P wykazują wysoką ekspresję na etapie rozwoju embrionalnego układu nerwowego (Harada i wsp. 2004). Neuronalne komórki progenitorowe (ang. neural progenitor cells, NPC) wykazują ekspresję wszystkich typów receptorów S1PR1–S1PR5, z wyjątkiem S1PR4. Najliczniej występuje receptor S1PR1, którego pobudzenie aktywuje migrację NPC do miejsc objętych uszkodzeniem (Kimura i wsp. 2007). W neuronach zlokalizowane są głównie receptory: S1PR1 oraz S1PR3, natomiast w mniejszym stopniu S1PR2 i S1PR5. W mikrogleju najliczniej występuje S1PR1. W oligodendrocytach najwyższą ekspresję wykazuje S1PR5, zaś w astrocytach S1PR3 (Blaho i Hla 2014; Chun i Hartung 2011; Kim i wsp. 2011) (**Schemat 6.**).

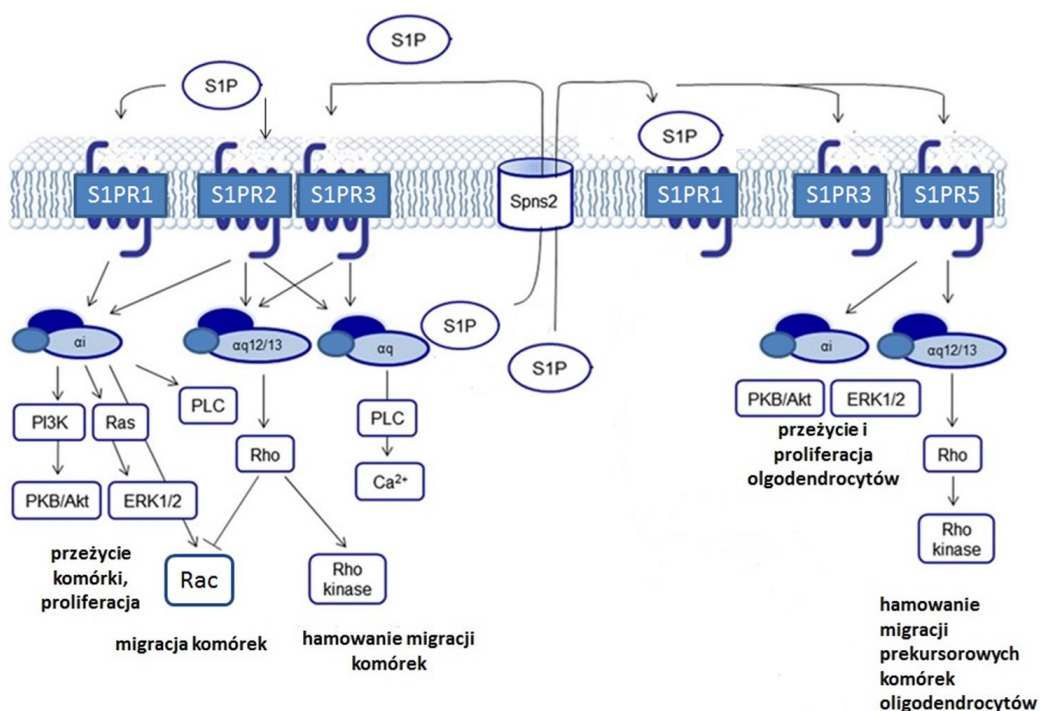


Schemat 6. Lokalizacja receptorów S1P w komórkach ośrodkowego układu nerwowego (schemat autorski).

objaśnienia skrótów: S1PR1-5 - receptory dla sfingozyno-1-fosforanu

Myszy z delecją receptora pierwszego S1P charakteryzuje zaburzony proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych oraz niedomknięcie cewy nerwowej, które prowadzą do śmierci zarodka. Podkreśla to istotną rolę S1PR1 w prawidłowym rozwoju embrionalnym. Śmiertelności na etapie rozwoju zarodkowego nie obserwuje się w przypadku delecji pozostałych receptorów. Rola poszczególnych receptorów S1P zależy od typu białek G oraz białek efektorowych z nimi sprzężonych. Kluczowym białkiem efektorowym szlaków zależnych od pobudzenia S1PR1 jest kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), sprzężona z kinazą Akt. S1PR1 aktywuje także białko Ras, które stymuluje ERK1/2. Kinazy Akt i ERK1/2 odpowiadają za fosforylację białek związanych z regulacją proliferacji, migracji i przeżycia komórki (**Schemat 7.**). Kresomózgowie u zarodków myszy *slpr1^{-/-}* wykazuje podwyższoną apoptozę i obniżoną mitozę (Mizugishi i wsp. 2005). S1P pośredniczy także w dojrzewaniu i rozroście NPC. W doświadczeniu na zarodkowych komórkach macierzystych pochodzących z kory mózgowej wykazano, że mechanizm ten polega na zwiększaniu produkcji laminy w astrocytach, która sprzyja rozrostowi NPC (Spohr i wsp. 2012). Badania hodowli komórkowej neuronów zwojowych korzeni grzbietowych wykazały, że S1PR1 bierze udział w procesie elongacji neurytów w odpowiedzi na NGF (Toman i wsp. 2004). Receptor S1PR1 bierze udział w odpowiedzi bólowej. Myszy pozbawione ekspresji S1PR1 odporne są na odpowiedź bólową (Mair i wsp. 2011). Inna grupa dowiodła, że w modelu bólu pooperacyjnego, myszy z podwójną homozygotyczną delecją S1PR3 (*slpr3^{-/-}*) wykazują obniżoną odpowiedź w stosunku do myszy *slpr1^{-/-}*, co wskazuje na istotną rolę S1PR3 w odpowiedzi bólowej (Camprubi-Robles i wsp. 2013). S1PR2 oraz zależna od niego aktywacja białka Rho, w przeciwieństwie do pobudzenia S1PR1, odgrywa istotną rolę w hamowaniu migracji NPC do miejsc objętych uszkodzeniem. Podanie antagonisty S1PR2 (JTE-013) lub wyciszenie jego RNA, istotnie zwiększa migrację komórek do miejsc uszkodzonych w wyniku niedokrwienia mózgu (Kimura i wsp. 2008). Receptory S1P w komórkach opiekuńczych neuronów wykazywać mogą różną ekspresję w zależności od stadiów rozwoju danej komórki, podczas których wywierają różną funkcję. Regulacja funkcji oligodendrocytów odbywa się głównie za pośrednictwem S1PR5. Receptor ten pośredniczy w indukowanym przez białka Rho/ROCK hamowaniu migracji prekursorowych komórek oligodendrocytów oraz

aktywowanym przez kinazę Akt przekazywaniu sygnału pro-życiowego w dojrzałych oligodendrocytach (**Schemat 7.**).



Schemat 7. Mechanizm działania S1P. Zmodyfikowano wg Brunkhorst i wsp. (2014).

Objaśnienia skrótów: S1P – sfingozyno-1-fosforan, Spns2- białko Spinster 2 - transporter S1P, S1PR1-5 - receptory dla S1P, ai, aq12/13, aq – białka G sprzężone z receptorami dla S1P, Rho, Ras - białka należące do rodziny małych białek G, MAPK - kinazy aktywowane mitogenami, PKB/Akt - kinaza białkowa B, PI3K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, PKC - kinaza białkowa C, PLC - fosfolipaza C, ERK1/2 - kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym

Rola sfingozyno-1-fosforanu w chorobach neurodegeneracyjnych

Znakomita większość badań nad rolą Sphk1/2 oraz S1P dotyczy chorób nowotworowych, gdzie selektywna i trwała inhibicja aktywności Sphk1/2 jest cennym punktem uchwytu w planowaniu strategii terapeutycznej tych chorób. Ostatnio rośnie jednak liczba danych dotyczących znaczenia hamowania aktywności/ekspresji Sphk1/2 oraz protekcyjnej roli sygnału zależnego od pobudzenia receptorów dla S1P w chorobach neurodegeneracyjnych. Najlepszym tego dowodem jest wprowadzenie do kliniki fingolimodu (FTY720, nazwa handlowa Gilenya™) w terapii SM. Badania *post mortem*

tkanki mózgowej pacjentów z ChA wykazują zaburzenia ekspresji i aktywności enzymów odpowiedzialnych za syntezę i eliminację S1P, prowadzące do obniżenia poziomu tego sfingolipidu w mózgu. Stwierdzono obniżoną aktywność izoform Sphk1 i Sphk2 w hipokampie oraz części skroniowej istoty szarej pacjentów z ChA. W istocie szarej odnotowano także obniżenie aktywności fosfatazy S1P oraz obniżoną ekspresję liazy S1P. W badaniach *post mortem* pacjentów z ChA wykazano obniżony poziom S1P w rejonie CA1 hipokampa oraz w dolnym zakręcie skroniowym istoty szarej i białej, w porównaniu do materiału z kontrolnych grup wiekowych. Spadek poziomu S1P odpowiada stopniowi postępu choroby, mierzonej w skali Braak'a (Couttas i wsp. 2014). Badania z innego ośrodka potwierdzają obniżony poziom ekspresji Sphk1 oraz podwyższony poziom liazy S1P w rejonie kory śródwęchowej bogatej w złogi A β (Ceccom i wsp. 2014). Uzyskane dane dowodzą, że w utrzymaniu stałego poziomu S1P w komórce, obok enzymów syntetyzujących S1P (Sphk1/2), fundamentalną rolę odgrywają liaza i fosfataza S1P, czyli enzymy odpowiedzialne za jego degradację. Istotne jest także zachwianie równowagi pomiędzy poziomem S1P, a ceramidem na korzyść ceramidu. W rejonie czołowo-skroniowym istoty szarej mózgów autopsyjnych pacjentów z ChA, wykazano wzrost ekspresji kwaśnej sfingomielinazy, która prowadzi do wzrostu poziomu ceramidu. Zmianom tym towarzyszy obniżenie poziomu S1P, który wiąże się z jego obniżoną syntezą (He i wsp. 2010). Warto zaznaczyć, że poziom ceramidu w płynie mózgowo-rdzeniowym, który u pacjentów z ChA jest niemal dwukrotnie podwyższony w porównaniu do osób zdrowych, może być istotnym kryterium diagnostycznym ChA (Sato i wsp. 2005). Istnieją dowody, że w komórkowym modelu ChA zwiększona synteza S1P może mieć efekt neuroprotektoryjny. Nadekspresja Sphk1 w hodowli komórek neuronalnych chroni je przed apoptozą wywołaną toksycznością peptydów A β (A β 25–35). Zaobserwowano, że peptydy A β prowadzą do hamowania ekspresji/aktywności Sphk1, obniżenia poziomu S1P oraz żywotności komórek. Zjawiska molekularne wywołane toksycznością peptydów A β są podobne do tych, które towarzyszą wyciszeniu genu dla Sphk1, co dowodzi istotnej roli Sphk1/S1P w patomechanizmie ChA (Gomez-Brouchet i wsp. 2007; Yang i wsp. 2014). Badania Takasugi i wsp. (2011) wykazały, że w mózgach pacjentów z ChA dochodzi do wzrostu ekspresji Sphk2, a S1P syntetyzowany przez tę izoformę łączy się z β -sekreazą A β (BACE) na całej długości, stymulując jej aktywność katalityczną oraz

produkcję toksycznych peptydów A β . Dane te wskazują na odmienną rolę S1P, syntetyzowaną przez różne izoformy Sphk1/2, zlokalizowane w innych przedziałach komórkowych.

Działanie fingolimodu w układzie nerwowym

FTY720 jest pierwszym analogiem sfingozyny, który zyskał zastosowanie kliniczne. Jest on doustnym lekiem immunosupresyjnym (Gilenya TM) stosowanym w modyfikacji przebiegu ustępująco-nawracającej postaci SM o dużej aktywności (Brinkmann i wsp. 2010; Kappos i Radue 2010; Sanford 2014). Pacjenci z SM długotrwanie leczeni FTY720 (dwuletnia terapia dzienną dawką 0,5 mg) wykazują zmniejszoną utratę objętości mózgu, przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby nawrotów choroby i znacznym spowolnieniu postępu niepełnosprawności, co sugeruje, że poza działaniem immunosupresyjnym, FTY720 wykazuje właściwości neuroprotektcyjne (Radue i wsp. 2012). Lek podawany w postaci nieaktywnej ulega *in vivo* fosforylacji przez Sphk2 do aktywnego metabolitu - fosforanu fingolimodu (FTY720-P). Sphk2 fosforyluje FTY720 z 30-krotnie większą wydajnością niż Sphk1, co związane jest głównie z niższą wartością K_m dla Sphk2 (Billich i wsp. 2003). FTY720-P jest modulatorem wszystkich receptorów dla S1P, z wyjątkiem S1PR2. Dane literaturowe wskazują na preferencję wiązania tego związku do S1PR1 oraz w mniejszym stopniu do S1PR3 i S1PR5 (Brunkhorst i wsp. 2014; Anastasiadou i Knöll 2016; Deogracias i wsp. 2012). Do niedawna za główny mechanizm działania FTY720 uznawano internalizację w węzłach chłonnych autoagresywnych limfocytów T, które mogą uszkadzać tkankę nerwową. Obecnie większość badań poświęconych FTY720 nakierowana jest na jego bezpośrednie neuroprotektcyjne działanie w OUN. Pierwszy ze wskazanych szlaków działania FTY720, czyli hamowanie uwalniania limfocytów z narządów limfatycznych, odbywa się w dwojaki sposób –w mechanizmie kontroli migracji limfocytów oraz kontroli uwalniania ich ze zrzębu. W obu przypadkach kluczową rolę pełni receptor pierwszy S1PR1, do którego FTY720-P wykazuje wysokie powinowactwo. Wzrost stężenia S1P jest bodźcem chemotaktycznym dla limfocytów T, który odpowiada za ich ukierunkowaną migrację z narządów limfatycznych do chłonki i krwi (Schwab i wsp. 2005). FTY720-P wiążąc się z S1PR1 na powierzchni limfocytów T, zmniejsza dostępność receptora dla S1P, co hamuje reakcję limfocytów

na bodziec chemotaktyczny, jakim jest wzrastające stężenie S1P. Trwałe połączenie FTY720-P z S1PR1 na powierzchni limfocytów powoduje jego internalizację i wzrost degradacji (Sykes i wsp. 2014). W drugim mechanizmie, kontroli wyjścia limfocytów ze zrębu, FTY720-P wiążąc się z S1PR1 na powierzchni komórek śródbłonka, uruchamia kaskadę zmian, w wyniku których dochodzi do uszczelniania bariery śródbłonkowej i nagromadzenia limfocytów w układzie limfatycznym (Imeri i wsp. 2014). FTY720-P zmniejsza więc liczbę autoagresywnych komórek w OUN, które mogłyby uszkadzać tkankę nerwową. W ciągu 4–6 godz. po podaniu jednej doustnej dawki fingolimodu (0,5 mg) liczba limfocytów we krwi obwodowej zmniejsza się do ok. 75% wartości wyjściowej. Długotrwałe podawanie leku prowadzi także do utrzymania liczby limfocytów na niskim poziomie.

FTY720 ma także zdolność przenikania bariery krew-mózg, gdzie ulega fosforylacji i działa w mechanizmie zależnym od pobudzenia receptorów S1P, głównie S1PR1, S1PR3 oraz S1PR5 (Brunkhorst i wsp. 2014). Oprócz obwodowego działania immunosupresyjnego, ten analog sfingozyny wywierać może bezpośredni neuroprotektoryjny efekt w OUN, co zostało udowodnione w modelach *in vitro* i *in vivo* chorób neurologicznych, m.in. modelu demielinizacji OUN (Słowik i wsp. 2014), autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (Seki i wsp. 2013, Choi i wsp. 2011), wirusowego zapalenia mózgu (Blanc i wsp. 2014), urazu rdzenia kręgowego (Lee i wsp. 2009; Norimatsu i wsp. 2012), niedokrwieniu mózgu (Hasegawa i wsp. 2010), modelu zespołu Rett'a (Deogracias i wsp. 2012), toksyczności A β (Takasugi i wsp. 2013) oraz toksyczności indukowanej przez białka prionowe (Moon i wsp. 2013). Dokładny mechanizm działania FTY720 nie jest w pełni poznany, jednak ważną rolę odgrywać może wzrost syntezy neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor BDNF) (Deogracias i wsp. 2012), hamowanie procesu zapalnego w mikrogleju oraz wzrost syntezy czynników troficznych (Noda i wsp. 2013). Ostatnie badania Hait i wsp. (2014) wykazały, że FTY720-P podobnie jak S1P hamując aktywność jądrowej deacetylazy histonowej (HDAC1), zwiększa ekspresję genów związanych m.in. z procesami uczenia się i pamięci. Ponadto FTY720-P aktywować może fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. cAMP-response-element-binding protein), który reguluje ekspresję m.in. BDNF (Deogracias i wsp. 2012). W ostatnich dwóch dekadach zwrócono szczególną uwagę na udział zaburzeń

bioaktywnych lipidów w procesach neurodegeneracyjnych i w mechanizmie śmierci neuronów. Liczne enzymy zaangażowane w regulację metabolizmu lipidów proponowane są jako obiecujące punkty uchwytu dla skuteczniejszej terapii chorób neurodegeneracyjnych.

Założenia i cel pracy

Ostatnie lata przyniosły przełom w dziedzinie badań nad rolą sfingolipidów w biologii komórki. Szczególnie dotyczy to znaczenia S1P, jego receptorów oraz enzymów metabolizujących S1P. Enzymami odpowiadającymi za syntezę S1P są kinazy sfingozyny Sphk1 i Sphk2. Degradację S1P regulują specyficzne fosfatazy (SPP1 i SPP2) oraz liaza S1P (SPL). Syntetyzowany przez Sphk1 S1P jest transportowany do przestrzeni pozakomórkowej przez transportery ABC i wywiera działanie za pośrednictwem pięciu receptorów błonowych, sprzężonych z białkami G (S1PR1-S1PR5). Obniżenie poziomu ekspresji i aktywności Sphk1, a tym samym syntezy S1P może odgrywać istotną rolę w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych, w tym ChA i SM. Stymulacja szlaków przekazywania zależnych od receptorów S1P jest wykorzystywana w terapii SM. Do chwili obecnej znaczenie udziału zaburzeń metabolizmu sfingolipidów i zależnych od pobudzenia receptorów S1P szlaków sygnalizacyjnych w patologii ChP jest słabo poznane. Niniejsze badania opierają się na hipotezie, że zmiana ekspresji/aktywności Sphk1 i homeostazy bioaktywnych sfingolipidów może być istotna w aktywacji procesów molekularnych prowadzących do śmierci komórek i zaburzeń lokomotorycznych w doświadczalnych modelach ChP.

Celem rozprawy było zbadanie poziomu ekspresji i aktywności kinazy sfingozyny 1 (Sphk1) w modelach ChP oraz zależnych od Sphk1 szlaków przekazywania zaangażowanych w mechanizm śmierci komórek i zaburzenia aktywności ruchowej zwierząt w modelach ChP. Ponadto badania dotyczyły neuroprotektoryjnego wpływu fingolimodu (FTY720) – modulatora receptorów S1P i pramipeksolu (PPX) - agonisty receptorów D2/D3 na wybrane procesy molekularne oraz funkcję lokomotoryczną zwierząt w modelach ChP.

Realizacja celu badań w modelu komórkowym toksyczności MPP+ dotyczyła:

- 1) Udziału Sphk1, Sphk2, SPP1 i SPL w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP+ w komórkach SH-SY5Y.
- 2) Znaczenia farmakologicznego zahamowania aktywności Sphk1 i jej wpływu na poziom wolnych rodników oraz procesy molekularne regulujące żywotność komórek SH-SY5Y.

3) Działania cytoprotekcyjnego agonistów i modulatorów receptorów S1P z uwzględnieniem FTY720-P.

Realizacja celu badań w modelu zwierzęcym ChP uwzględniała:

1) Wpływ MPTP na poziom immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej i ocenę działania FTY720 - modulatora receptorów S1P oraz pramipeksolu (PPX) - agonisty receptorów D2/D3.

2) Ocenę poziomu ekspresji/aktywności Sphk1 w prążkowie i śródmózgowiu w mysim modelu ChP oraz działanie FTY720 i PPX.

3) Szlaki molekularne regulujące procesy przeżycia i śmierci komórek w prążkowie i śródmózgowiu myszy po podaniu MPTP oraz FTY720 i PPX.

4) Wpływ FTY720 i PPX na aktywność motoryczną myszy w modelu ChP.

Materiały i Metody

Komórkowy model doświadczalny stresu oksydacyjnego wywołany 1-metylo-4-fenylopirydyną (MPP+)

Ludzka linia komórkowa SH-SY5Y

Komórkowy model doświadczalny stanowiła ludzka linia komórkowa *neuroblastoma* SH-SY5Y - nerwiak płodowy współczulny, wywodzący się z komórek cewy nerwowej. Komórki SH-SY5Y stanowią jednorodną linię komórkową o fenotypie neuronalnym (Xie i wsp. 2010). Linia ta jest trzykrotnym klonem linii komórkowej *neuroblastoma* SK-N-SH, która została wyizolowana w 1970 roku z materiału biopsyjnego pochodzącego ze szpiku kostnego 4-letniego pacjenta z nerwiakiem płodowym (Biedler i wsp. 1973). We wczesnych latach osiemdziesiątych zyskała ona szerokie zastosowanie jako model neuronalny, ze względu na wiele funkcjonalnych i biochemicznych właściwości neuronów. Komórki SH-SY5Y są szeroko stosowanym modelem badawczym w doświadczeniach *in vitro* nad molekularnymi mechanizmami prowadzącymi do przeżycia lub śmierci komórek nerwowych, ze szczególnym uwzględnieniem zmian molekularnych obserwowanych w ChP. Linia SH-SY5Y wykazuje szereg cech znamienych dla neuronów dopaminergicznych. Po pierwsze, komórki te mają zdolność syntezy DA i noradrenaliny, dzięki aktywności enzymów takich jak hydroksylaza tyrozynowa oraz β -hydroksylaza DA (Oyarce i Fleming 1991). Po drugie, komórki SH-SY5Y wykazują ekspresję receptorów DA i transportera DA (DAT), który jest białkiem znamienym dla neuronów dopaminergicznych w obrębie OUN. DAT reguluje homeostazę DA, uczestnicząc w jej transporcie do komórki nerwowej oraz sekwestracji (Takahashi i wsp. 1994). DAT jest również preferencyjnym transporterem neurotoksyny 1-metylo-4-fenylopirydyny (MPP+), dlatego linia komórkowa SH-SY5Y jest powszechnie wykorzystywana do badania mechanizmów neurotoksyczności indukowanej przez MPP+ (Xie i wsp. 2010). Po trzecie, pomimo niskiego poziomu ekspresji receptorów DA, agoniści receptorów DA o właściwościach neuroprotektynnych, wywierają swój pro-zyciowy efekt w komórkach SH-SY5Y (Joyce et al. 2003; Presgraves et al. 2004). Ponadto komórki te wykazują ekspresję receptorów

opiodowych i muskarynowych oraz receptorów dla neuronalnych czynników wzrostu (Ciccarone i wsp. 1989). W obecności niektórych związków farmakologicznych linia komórkowa SH-SY5Y przybiera bardziej wyrazisty fenotyp neuronów dopaminergicznych, lub ulega zróżnicowaniu do pierwotnych neuronów śródmózgowia. Komórki SH-SY5Y, w zależności od zastosowanych związków, mogą być też różnicowane w kierunku neuronów o fenotypie adrenergicznym lub cholinergicznym. Traktowanie komórek SH-SY5Y estrami forbolu inicjuje ich różnicowanie w kierunku fenotypu adrenergicznego, natomiast inkubacja z kwasem retinowym (RA) w kierunku fenotypu cholinergicznego (Påhlman i wsp. 1984; Adem i wsp. 1987). Niektóre środki, takie jak RA, nadają komórkom SH-SY5Y tolerancję na związki toksyczne m.in. przez aktywację pro-zyciowej kinazy Akt, wzrost ekspresji anti-apoptotycznego białka Bcl-2 i jednocześnie obniżenie ekspresji pro-apoptotycznego białka p53 (Cheung i wsp. 2009; Tieu i wsp. 1999). W związku z powyższym, do oceny neurotoksyczności MPP+ i właściwości neuroprotektoryjnych wybranych związków za lepszy model uznawane są nieróżnicowane komórki SH-SY5Y (Xie i wsp. 2010; Cheung i wsp. 2009) i takie zastosowano w niniejszej rozprawie.

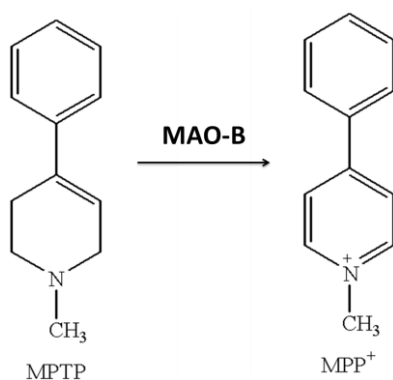
Warunki hodowli komórek SH-SY5Y

Nieróżnicowane komórki SH-SY5Y (Sigma-Aldrich) hodowane były w mieszaninie mediów Minimum Essential Medium Eagle/Nutrient Mixture F-12 Ham (MEM/F12 Ham, w proporcji 1:1, Sigma – Aldrich) z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. fetal bovine serum), inaktywowanej w 56°C, 2 mM glutaminy, mieszaniny aminokwasów (Sigma – Aldrich) oraz antybiotyków (50 jednostek/ml penicyliny, 50 µg/ml streptomycyny). Hodowlę prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych szalkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającej 5% CO₂. Morfologię komórek w trakcie hodowli, a następnie po podaniu badanych związków chemicznych, obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41.

Indukcja stresu oksydacyjnego z użyciem neurotoksyny - 1-metylo-4-fenylpirydyny (MPP+)

Do eksperymentów stosowano komórki między 5 a 12 pasażem. Komórki liczone za pomocą automatycznego czytnika liczby komórek (Bio Rad). Komórki SH-SY5Y

wysiewano z gęstością $1-1,5 \times 10^6$ komórek na szalkę o średnicy 10 cm, 5×10^5 komórek na szalkę o średnicy 6 cm lub 7×10^3 /dołek płytki 96-dołkowej pokrytej kolagenem. Po 24 godz. od wysiania komórek, medium hodowlane wymieniano na medium zawierającą 2% FBS oraz 2 mM glutaminę, aminokwasy i antybiotyki w stężeniach takich jak w medium hodowlanym. Następnie komórki traktowano wodnym roztworem jodku 1-metylo-4-fenylpirydyny (MPP^+ J), przygotowywanym *ex tempore* (Sigma-Aldrich).

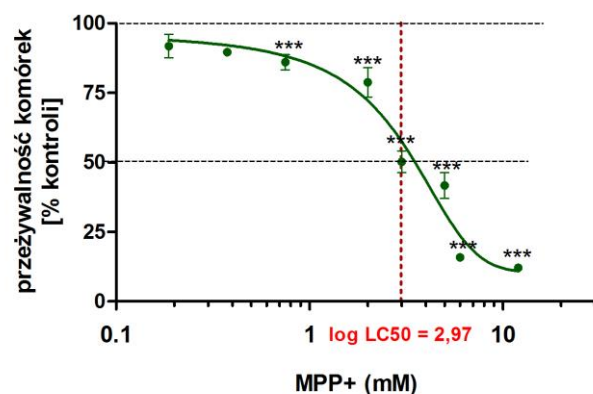


Schemat 8. Wzór chemiczny toksyny MPTP/MPP⁺.

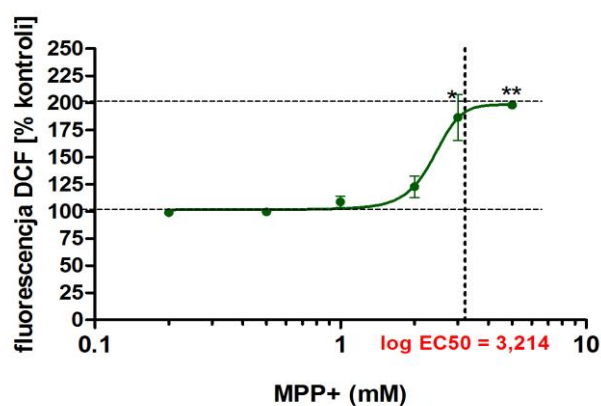
objaśnienia skrótów: MPTP - 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna, MPP⁺- 1-metylo-4-fenylpirydyna, MAO-B –monoaminooksydaza typu B

Początkowo komórki poddano inkubacji z MPP⁺ w zakresie stężeń 0,2-10 mM w czasie 24 godz. (**Rycina 1A.**), celem określenia wartości LC₅₀, (ang. lethal concentration), czyli stężenia toksyny, przy którym żywotność komórek maleje do połowy wartości kontrolnej hodowli komórek inkubowanej bez MPP⁺, ale w tych samych warunkach (górna linia kropkowa). Na podstawie krzywej żywotności określono wartość LC₅₀ = 2,986 mM. W oparciu o krzywą zależności poziomu wolnych rodników (WR) od stężenia toksyny MPP⁺ wyznaczono wartość efektywnego stężenia toksyny MPP⁺, przy którym odnotowano dwukrotny wzrost poziomu WR. Wynosiła ona 3,214 mM (**Rycina 1B.**). Na podstawie tej wartości oraz LC₅₀ = 2,986 mM uśrednione stężenie 3 mM zostało wybrane do kolejnych doświadczeń.

A



B



Rycina 1. Wpływ 24-godzinnej inkubacji komórek SH-SY5Y z MPP+ na żywotność komórek i poziom wolnych rodników.

Komórki SH-SY5Y inkubowano z MPP+ (0,2-10 mM) przez 24 godz. Wykresy przedstawiają wyniki analizy żywotności, wykonanej metodą testu MTT (A) oraz analizy poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF (B). Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń w czterech-sześciu powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek nietraktowanych MPP+.

Farmakologiczna modyfikacja odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny wywołany MPP+

Badane związki: sfingozyno-1-fosforan (S1P) i agoniści/antagoniści receptorów dla S1P oraz inhibitory wybranych szlaków sygnalizacyjnych (Apocynina, Z-DEVD-FMK) dodawano 1 godz. przed podaniem MPP+.

Kontrolami w prowadzonych doświadczeniach były komórki SH-SY5Y:

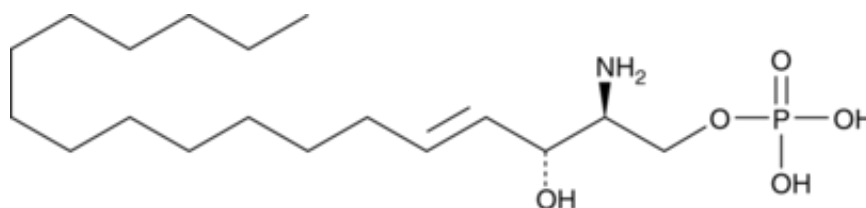
- nie poddane działaniu MPP+,
- traktowane stosowanymi w doświadczeniach związkami np. S1P,
- poddane działaniu odpowiednich rozpuszczalników takich jak: DMSO i etanol.

Nie stwierdzono wpływu stosowanych rozpuszczalników na żywotność komórek SH-SY5Y i poziom wolnych rodników.

Charakterystyka i wzory chemiczne związków stosowanych w modelu in vitro

W prowadzonych badaniach stosowano następujące związki, których stężenia zostały wybrane na podstawie dostępnej literatury:

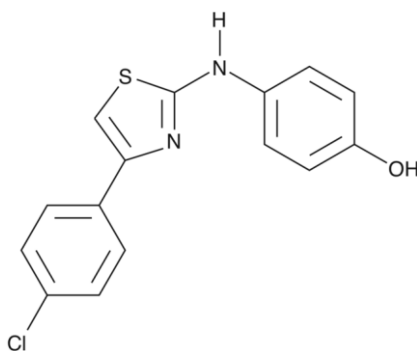
1) Sfingozyno-1-fosforan (S1P), Enzo Life Sciences, rozpuszczony w metanolu, przechowywany w stężeniu 1 mM w temperaturze -20°C. Bezpośrednio przed eksperymentem metanol odparowywano, a pozostały w postaci filmu S1P rozpuszczano w roztworze wodnym albuminy surowicy bydlęcej (0,4% BSA). S1P stosowano w stężeniu końcowym 1 μM.



Schemat 9. *Wzór chemiczny sfingozyno-1-fosforanu (S1P), czyli fosforanu D-erytro-(2-amino-4-octadecen-1,3-diolu)*

2) Agonista receptorów S1PR1, S1PR3, S1PR4 i S1PR5 – fingolimod w formie ufosforylowanej (FTY720-P), Cayman Biochemicals, rozpuszczony w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 100 pM

- 3) Agonista receptora S1PR1 – SEW2871, Cayman Biochemicals, rozpuszczony w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 10 μ M
- 4) Antagonista receptora S1PR1 – W123, Cayman Biochemicals, rozpuszczony w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 20 μ M
- 5) Antagonista receptora S1PR1 i S1PR3 – VPC23019, rozpuszczony w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 1 μ M
- 6) Antagonista receptora S1PR2 – JTE-013, rozpuszczony w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 1 μ M
- 7) Inhibitor kaspazy-3 - keton Z-Asp(O-Me)-Glu(O-Me)-Val-Asp(O-Me)fluorometylowy (Z-DEVD-FMK, R&D Systems), rozpuszczony w DMSO, stosowany w stężeniu końcowym 100 μ M
- 8) Inhibitor oksydazy NADPH – 4'-hydroksy-3'-metoksyacetofenon, (synonim – Apocynina (Apoc.), Sigma – Aldrich), rozpuszczony w DMSO i wodzie w stosunku (1:1), stosowany w stężeniu końcowym 0,5 mM
- 9) W doświadczeniach nad mechanizmem śmierci komórek w warunkach stresu wywołanego MPP+ jako pozytywną kontrolę wykorzystano aktywator apoptozy zależnej od kaspaz, czyli staurosporynę (STS, Sigma – Aldrich) – naturalny antybiotyk wyizolowany z bakterii *Streptomyces staurosporeus*. STS jest stosowana *in vitro* w celu aktywacji apoptozy komórek. Efekty biologiczne STS wynikają z jej zdolności inhibicji kinaz białkowych, przez uniemożliwienie związania ATP. STS rozpuszczalna była w wodzie i stosowana w stężeniu 1 μ M.
- 10) W doświadczeniach nad mechanizmem śmierci komórek w warunkach farmakologicznego hamowania aktywności Sphk1, zastosowano specyficzny inhibitor Sphk1 - 2-(p-hydroksyanilino)-4-(p-chlorofenylo)tiazol (SKI II), rozpuszczony w DMSO i stosowany w stężeniu końcowym 5 μ M.



Schemat 10. Wzór chemiczny inhibitora Sphk1, 2-(p-hydroksyanilino)-4-(p-chlorofenylo)tiazolu - SKI II

Otrzymywanie frakcji podkomórkowych

Przygotowanie frakcji podkomórkowych odbywało się wg metody opisanej przez Wang i wsp. (2004). Komórki SH-SY5Y, po inkubacji z odpowiednimi związkami, płukano dwukrotnie buforem PBS (ang. phosphate buffer saline), a następnie zawieszano w buforze hipotonicznym zawierającym 10 mM Tris-HCl o pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT i mieszaninę inhibitorów proteaz Complete (Roche Diagnostics). Po 5 minutowej inkubacji w 4°C w w/w buforze, komórki homogenizowano za pomocą strzykawki z integralną igłą o średnicy 0,3 mm, przeciągając tłok 12 razy, co ustalono kontrolując jakość homogenizacji pod mikroskopem. Homogenat (10% w/v) wirowano 10 min. z przyspieszeniem 500 x g w 4°C. Osad (pellet, P1) zawierający zgrubną frakcję jądrową zawieszano w 25 mM buforze Tris-HCl o pH 7,4 z inhibitorami proteaz. Nadsącz (supernatant, S1) wirowano 15 min. z przyspieszeniem 15 000 x g w 4°C do otrzymania zgrubnej frakcji mitochondrialnej (P2) i cytozolowej (S2). Zgrubną frakcję mitochondrialną (P2) zawieszano w 25 mM buforze Tris-HCl o pH 7,4 z inhibitorami proteaz. Uzyskany w ten sposób materiał używano do oznaczania białek metodą Western blot w zgrubnej frakcji mitochondrialnej oraz do oznaczania aktywności Sphk1 i Sphk2 odpowiednio w zgrubnej frakcji cytozolowej i w zgrubnej frakcji jądrowej.

Zwierzęcy model doświadczalny ChP, wywołany działaniem 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP)

Zwierzęta doświadczalne

Do eksperymentu wykorzystano dorosłe, 12-tygodniowe myszy szczepu C57BL/6, samce o masie 20 – 25 g. Zwierzętom zapewniono optymalne warunki klimatyczne o stabilnej temperaturze i wilgotności, z 12-godzinnym cyklem oświetlenia i nieograniczonym dostępem do wody i standardowej diety laboratoryjnej. Myszy pochodziły z hodowli Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Doświadczenia z udziałem zwierząt były wykonywane wg zasad prawa etycznego, zgodnego z Konwencją Europejską, na podstawie zezwolenia wydanego przez IV Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie (uchwała nr 96/2012 z dnia 04.12.2012 r.;

do wniosku rozszerzonego uchwała nr 34/2014 z dnia 17.07.2014 r.). Łączna liczba zwierząt wykorzystanych do doświadczeń była minimalna dla osiągnięcia istotności statystycznej i wynosiła 45 zwierząt. Z uwagi na wysoki stopień toksyczności MPTP zachowano bardzo restrykcyjne procedury bezpieczeństwa pracy. Eksperymenty prowadzono w Środowiskowym Laboratorium Badań Toksykologicznych (LBT) Centrum Medycyny Doświadczalnej CePT (CMD-CePT). Zwierzęta rozdzielono do klatek na grupy badawcze i poddano 2-dniowej habituacji przed podaniem MPTP w celu ustabilizowania równowagi hormonalnej i enzymatycznej, m.in. stabilizacji stopnia aktywności MAO-B, która w mózgu metabolizuje MPTP do MPP+. Zwierzęta (po 3-5 sztuk) umieszczono w klatkach zaopatrzonych w filtr z systemem IVC (ang. individually ventilated cage system), umieszczonych w regale wentylowanym. W czasie trwania doświadczeń i 2 tygodnie po nich nie przechowywano innych zwierząt w pomieszczeniu. Eksperymentatora obowiązywał strój ochronny (półmaska filtrująca P3, kombinezon pyło-chemoochronny, metalowa przyłbica, ochraniacze na obuwiu oraz gogle ochronne i podwójne rękawice nitrylowe). Powierzchnie robocze po zakończonej pracy poddawane były dezaktywacji roztworem wybielacza oraz dezynfekcji, natomiast jednorazowe elementy stroju, odpady medyczne i ściółka poddawane utylizacji.

Procedura podawania MPTP

Chlorowodorek 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP x HCl, Axon Medchem) w postaci proszku przechowywany był w szczelnie zamkniętej oznakowanej ampulce w +4° C w specjalnie wydzielonej przestrzeni na odczynniki toksyczne w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału. Przygotowywanie roztworu MPTP odbywało się zawsze w dniu eksperymentu pod dygestorium w pomieszczeniu, gdzie wykonywane były iniekcje. Zastosowano schemat toksyczności ostrej. Ampułkę chlorowodoru MPTP rozpuszczano w wyliczonej objętości soli fizjologicznej do wstrzykiwań i roztwór podawano w 3 dootrzewnowych iniekcjach z 2-godzinnymi przerwami dla uzyskania sumarycznej dawki 40 mg/kg mc czystej toksyny MPTP, co odpowiadało 47 mg/kg mc MPTP x HCl (Jackson-Lewis i wsp. 2012) zgodnie z procedurą opisaną przez Chalimoniuk i wsp. (2006, 2007, 2009). Myszy kontrolne otrzymały iniekcję z soli fizjologicznej. Piętnastego dnia myszy były dekapitowane. Do kolejnych analiz wyizolowano prądkowie (spulowane prawe i lewe) i śródmózgowie (łącznie z istotą czarną).

Farmakologiczna modyfikacja odpowiedzi wybranych partii mózgu na stres wywołany działaniem MPTP

Myszy podzielono na 6 grup doświadczalnych:

I grupa (MPTP) – poddana działaniu MPTP, sumaryczna dawka - 40 mg/kg mc, podana w 3 dootrzewnowych iniekcjach z 2-godzinnymi przerwami

II grupa kontrolna - poddana działaniu 0,9% NaCl podawanej w takim samym schemacie jak MPTP

III grupa MPTP/FTY720 - poddana działaniu MPTP i fingolimodu (FTY720, Sigma-Aldrich) - po ostatniej iniekcji MPTP oraz przez 10 kolejnych dni podawano dootrzewnowo FTY720 (1mg/kg mc/24 godz.)

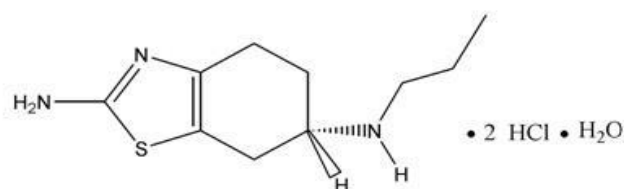
IV grupa MPTP/PPX poddana działaniu MPTP i pramipeksolu (PPX, Sigma-Aldrich) - po ostatniej iniekcji MPTP oraz przez 10 kolejnych dni podawano dootrzewnowo PPX (1mg/kg mc/24 godz.)

V kontrolna grupa FTY720 - otrzymywała sam FTY720, bez MPTP, w tym samym schemacie co grupa nr III

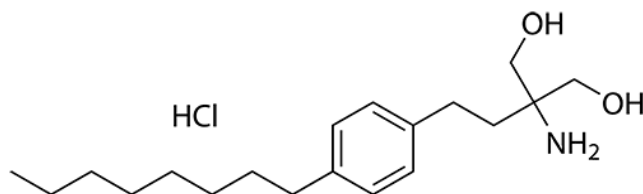
VI kontrolna grupa PPX - otrzymywała sam PPX, bez MPTP, w tym samym schemacie co grupa nr IV

Charakterystyka i wzory chemiczne związków stosowanych w modelu in vivo

A



B



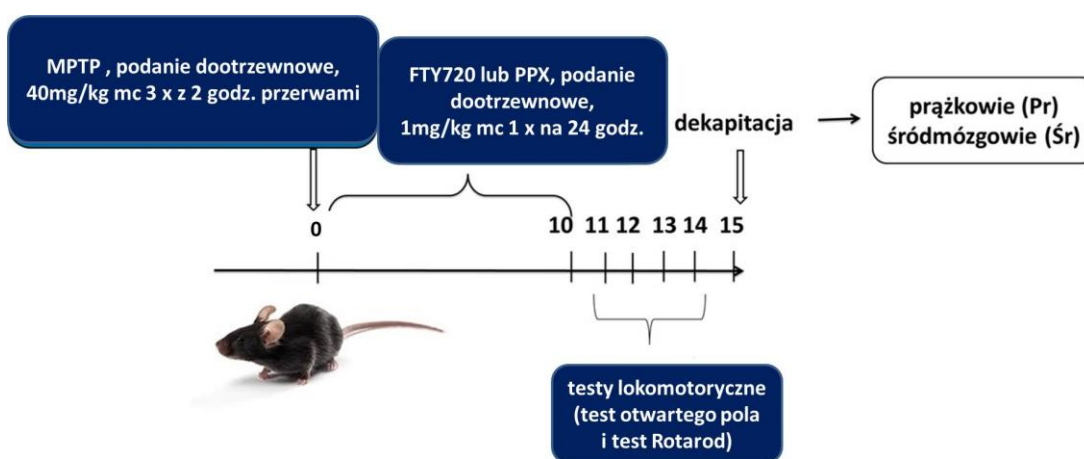
Schemat 11. Wzory chemiczne następujących związków:

A- *jednowodny dichlorowodorek (S)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-(propyloamino) benzotiazolu (PPX x 2HCl x H₂O)* B- *chlorowodorek 2-amino-2-[2-(4-octyl-fenyl)-etyl]-propane-1,3-diolu (FTY720 x HCl).*

pramipeksol S(-) PPX – agonista receptorów dopaminergicznych D2/D3. Działa na receptory D3 silniej niż na receptory D2. Lek jest efektywny w monoterapii we wczesnej fazie ChP, jak i w terapii skojarzonej z lewodopą w późniejszym stadium choroby. PPX wykazuje też efekt neuroprotekcyny niezależny od pobudzenia receptorów dopaminergicznych. W niniejszych doświadczeniach stosowano aktywną lewoskrętną postać PPX. Roztwór PPX x 2HCl x H₂O (Sigma-Aldrich) do iniekcji dootrzewnowych przygotowywano *ex tempore* przez rozpuszczenie w soli fizjologicznej pod dygestorium.

ingolimod (FTY720) – agonista receptorów S1PR1, S1PR3, S1PR4 i S1PR5. Jest doustnym lekiem immunosupresyjnym (nazwa handlowa Gilenya™) w modyfikacji przebiegu ustępująco-nawracającej postaci SM. FTY720 x HCl (Sigma-Aldrich) do iniekcji dootrzewnowych przygotowywano *ex tempore* przez rozpuszczenie w soli fizjologicznej pod dygestorium.

W 12,13 i 14 dniu eksperymentu przeprowadzono analizę behawioralną (test otwartego pola i test Rotarod), a następnie piętnastego dnia myszy dekapitowano (**Schemat 12.**). Do dalszych analiz wykorzystano prążkowie (prawe i lewe spulowane) oraz śródmózgowie (łącznie z istotą czarną), które izolowano na lodzie, natychmiastowo schładzano i przechowywano w – 80 °C. Wykonano w nich analizy ekspresji genów/poziomu białka oraz aktywności wybranych enzymów. Wykorzystano metody spektrofluorymetryczne, immunochemiczne oraz analizę PCR w czasie rzeczywistym.



Schemat 12. Schemat procedury badań *in vivo* zastosowany w niniejszej rozprawie.

objaśnienia skrótów: MPTP - 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna, PPX – pramipeksol, FTY720 - fingolimod

Przygotowanie materiału do badań

Zamrożoną tkankę z prawego i lewego prążkowiec a także tkankę z całkowitego śródmózgowia (łącznie z istotą czarną) homogenizowano w moździerzu w ciekłym azocie. Po uzyskaniu jednorodnego proszku, materiał z prążkowiec i śródmózgowia dzielono na pół i umieszczano w wolnych od RNAz, DNAz i pirogenów próbkach. Jedną połowę proszku z każdej struktury zalewano 1 ml odczynnika do izolacji RNA - TRI-reagent i w takiej postaci przechowywano w temperaturze -80°C . Drugą połowę zalewano 1 ml buforu lizującego do badania aktywności Sphk1, którą oznaczano tego samego dnia (opis metody poniżej). Pozostały po badaniu aktywności Sphk1 materiał mieszano z buforem denaturującym Laemmli i denaturowano 5 minut w temperaturze 95°C . W materiale tym wykonano immunodetekcję wybranych białek metodą Western blot.

Metody spektrofotometryczne

Oznaczanie stężenia białka

Zawartość białka w materiale z hodowli komórkowych oznaczano metodą Lowry'ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina (Lowry i wsp. 1951). Wyjątek stanowiło oznaczenie białka do analizy aktywności Sphk1/2, gdzie z uwagi na reakcję barwną fenolowego odczynnika Folina z buforem lizującym, zastosowano metodę opisaną w pracy Bradford (1976). Zawartość białka w homogenacie prążkowiec i śródmózgowia myszy oznaczano metodą Bradforda.

Analiza żywotności komórek za pomocą testu MTT

Test oparty jest na zdolności mitochondrialnego enzymu - dehydrogenazy bursztynianowej do przekształcania żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej - bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego, MTT) do formazanu o zabarwieniu fioletowym. Powstałe kryształy formazanu wymagają rozpuszczenia w rozpuszczalnikach organicznych (DMSO). Zdolność przeprowadzania powyższej reakcji mają tylko żywe i aktywne metabolicznie komórki, co pozwala na szybkie określenie wpływu badanego czynnika na żywotność danej linii komórkowej.

Komórki SH-SY5Y wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte kolagenem. Następnego dnia medium hodowlane wymieniano na medium z niską zawartością surowicy (2% FBS), w którym podawano MPP+ oraz badane związki. Po upływie czasu inkubacji medium wymieniano ponownie na medium pozbawione surowicy, w którym rozpuszczono MTT (0,25 mg/ml) i inkubowano przez 2 godz. w temperaturze 37°C. Następnie medium usuwano, a powstałe fioletowe kryształy formazanu rozpuszczano w DMSO i mierzono spektrofotometrycznie ich absorbancję przy długości fali 595nm za pomocą czytnika do mikropłytek BioRad. Intensywność fioletowej barwy jest proporcjonalna do ilości żywych i aktywnych metabolicznie komórek.

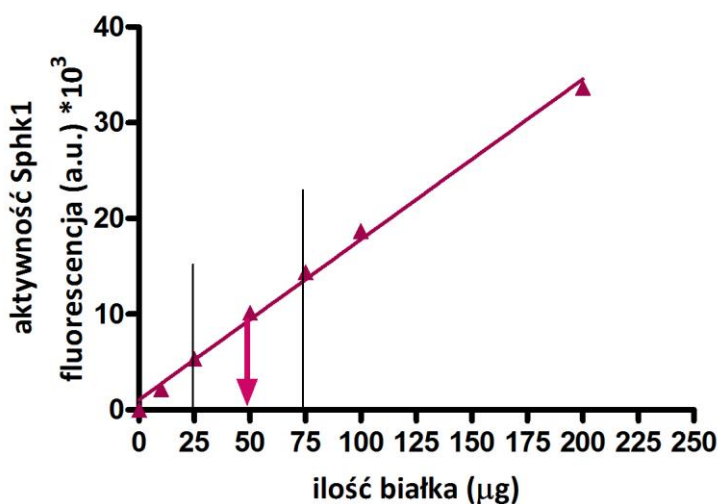
Analiza poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF

Analiza opiera się na reakcji przekształcenia dwuocianu 2',7'-dwuchlorodwuhydrofluoresceiny (H₂DCF-DA), na skutek wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do 2',7'-dwuchlorodwuhydrofluorescyny (H₂DCF), która następnie jest utleniana przez wolne rodniki do fluorescencyjnej 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF) (Royall i Ischiropoulos 1993). Komórki SH-SY5Y wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte kolagenem. Następnego dnia medium wymieniano na medium z niską zawartością surowicy (2% FBS), a komórki traktowano odpowiednimi związkami. Po 24 godz. medium usuwano i dodawano bufor Hank's (Sigma – Aldrich), o składzie CaCl₂ x 2H₂O – 0,185 g/l, MgSO₄ (bezwodny) – 0,09767 g/l, KCl – 0,4 g/l, KH₂PO₄ (bezwodny) – 0,06 g/l, NaHCO₃ – 0,35 g/l, NaCl – 8,0 g/l, Na₂HPO₄ (bezwodny) – 0,04788 g/l, D-Glukoza – 1,0 g/l. Następnie dodawano H₂DCF-DA (Sigma – Aldrich) w stężeniu końcowym 10 μM i inkubowano przez 50 min. w temperaturze 37°C, bez dostępu światła. Fluorescencję mierzono przy użyciu czytnika FLUOstar Omega przy długości fali pobudzenia 488nm i emisji 525nm.

Oznaczanie aktywności Sphk1 i Sphk2

Oznaczanie aktywności Sphk1 i Sphk2 przeprowadzono metodą spektrofluorymetryczną, przy zastosowaniu substratu fluorescencyjnego – NBD-sfingozyny, opracowaną i opisaną przez Don i wsp. (2007) oraz Takasugi i wsp. (2011) i stosowaną w pracach (Pyszko i Strosznajder 2014a; Pyszko i Strosznajder 2014b; Czubowicz i wsp. 2015). W homogenacie komórkowym zmierzono aktywność całkowitą

obydwu izoform Sphk1 i Sphk2. Następnie, przy zastosowaniu odpowiedniego składu buforu inkubacyjnego, zmierzono aktywność Sphk2 oraz Sphk1 odpowiednio w zgrubnej frakcji jądrowej (Sphk2) oraz frakcji cytozolowej (Sphk1). W homogenacie prązkowia i śródmózgowia myszy zmierzono aktywność Sphk1. Materiał z hodowli komórkowych przepłukany dwukrotnie buforem PBS oraz sproszkowaną tkankę zwierzęcą zawieszano w buforze do lizy o składzie: 50 mM HEPES o pH 7,4, 10 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 20% glicerol, 2 mM ortowanadzan sodu, 2 mM DTT, 10 mM NaF, 1 mM deoksyrydoksyna i inhibitory proteaz Complete (Roche). Lizat homogenizowano w temperaturze 4°C strzykawką insulinową, przeciągając tłok strzykawki 12 razy, a następnie wirowano przy 15 000 x g przez 15 min. Po odrzuceniu osadu oznaczano białko w nadsaczu metodą Bradforda. Do oznaczenia białka wyjątkowo zastosowano metodę Bradforda, gdyż w metodzie Lowry'ego tło buforu lizującego było zbyt silne aby dokonać oceny ilościowej. Do danej reakcji pobierano zawsze równą ilość białka z danego homogenatu (25-100 µg), którą wybrano z prostoliniowego zakresu krzywej zależności aktywności enzymu (wyrażonej jako jednostki arbitralne (a.u.) fluorescencji) od ilości użytego do reakcji białka. Przykładowy wykres przedstawiono poniżej (**Rycina 2.**).



Rycina 2. Krzywa zależności aktywności Sphk1 od ilości użytego do reakcji białka z homogenatu prązkowia.

Strzałką oznaczono ilość białka, jaka odpowiada średniej wartości z prostoliniowego zakresu krzywej powyższej zależności.

Z supernatantu frakcji podkomórkowych oraz homogenatu komórkowego pobierano 100 µg, natomiast z homogenatu prążkowiec i śródmózgowia 50 µg. Reakcję przeprowadzano w temperaturze 4 °C w następujących buforach inkubacyjnych wg Don i wsp. (2007):

- 1) Bufor do oznaczania aktywności Sphk1: 50 mM HEPES o pH 7,4, 15 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100, 10% glicerol, 2 mM ATP. Triton X-100 hamuje aktywność Sphk2.
- 2) Bufor do oznaczania aktywności Sphk2: 50 mM HEPES o pH 7,4, 15 mM MgCl₂, 0,5 M KCl, 10% glicerol, 2 mM ATP. W warunkach inkubacji z wysokim stężeniem KCl (0,5 M) hamowana jest aktywność Sphk1.
- 3) Bufor do oznaczania aktywności całkowitej Sphk1 i Sphk2: 50 mM HEPES o pH 7,4, 15 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10% glicerol, 2 mM ATP, 5 mM NaF, i 1 mM deoksyperydyna.

Do buforu dodawano substrat enzymów Sphk1 i Sphk2, czyli NBD-sfingozynę (Avanti Polar Lipids) w stężeniu końcowym 10 µM (zgodnie z zaleceniem producenta). Reakcję rozpoczynało dodawanie białka do buforu. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100 µl. Inkubację prowadzono przez 30 minut w temperaturze 30°C delikatnie mieszając (warunki zgodne z zaleceniem producenta). Reakcję zatrzymano przez dodanie 100 µl 1 M fosforanu potasu o pH 8,5, a następnie przez dodanie 250 µl mieszaniny chloroform/metanol (2:1). Następnie poprzez wytrząsanie i odwirowywanie przy 15 000 x g przez 1 min. przeprowadzano ekstrakcję produktu reakcji: NBD-S1P, który zebrał się w fazie wodnej. Substrat reakcji - NBD-sfingozyna pozostała w fazie organicznej. 100 µl górnej fazy wodnej łączono ze 100 µl dimetyloformamidu, przenoszono na 96-dołkową, czarną płytkę z przezroczystym dnem i mierzono fluorescencję przy użyciu czytnika Tecan infinite M1000Pro w stałych warunkach temperatury i mieszania, przy długości fali pobudzenia 485nm i emisji 538nm. Reakcja bez obecności enzymu (bez dodania białka) stanowiła próbę ślepą. Aktywność Sphk przedstawiono jako intensywności fluorescencji NBD-S1P wyrażoną w jednostkach arbitralnych (a.u.) wg Takasugi i wsp. (2011).

Analiza ekspresji genów

Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z komórek SH-SY5Y oraz śródmózgowia myszy w warunkach sterylnych używając odczynnika TRI-reagent (Sigma – Aldrich).

Sproszkowaną tkankę zwierzęcą oraz komórki zebrane z szalek o średnicy 6 cm, przepłukane dwukrotnie buforem PBS zawieszano w 1 ml odczynnika TRI-reagent w wolnych od RNAz, DNAz i pirogenów probówkach. Następnie do 1 ml homogenatu dodawano 200 µl chloroformu i energicznie mieszano przez 15 sekund, pozostawiano na 15 min. w temperaturze pokojowej i wirowano przy obrotach 12 000 g przez 10 min. w temperaturze 4°C. Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowych probówek, dodawano 0,5 ml zimnego izopropanolu, delikatnie mieszano i pozostawiano na 5 min. w temperaturze pokojowej. Następnie wirowano przez 10 min. przy obrotach 12 000 g w temperaturze 4°C. Osad przemywano trzykrotnie 1 ml 75% etanolu. Po kilkuminutowym odparowaniu etanolu z próbek, osad RNA zawieszano w 20 µl wody pozbawionej RNAz (RNase-free water, Ambion). Następnie, w aparacie NanoDrop (Thermo Scientific) mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną przy długości fali 260nm, natomiast zanieczyszczenie białkami i DNA - przy długości fali 280nm. Iloraz OD260/OD280 wynosił od 1,7 do 2,0. W celu oczyszczenia wyizolowanego mRNA z pozostałości DNA komórkowego, do nowych probówek przenoszono objętość, zawierającą 1 µg czystego mRNA i uzupełniano odczynnikami do trawienia DNA (Sigma – Aldrich) do objętości 10 µl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 min. w temperaturze 25°C. Następnie dodano 1 µl odczynnika zatrzymującego reakcję (Stop solution) i dalej prowadzono inkubację przez 10 min. w temperaturze 70°C. Po zakończeniu reakcji próbki przenoszono do lodu.

Reakcja odwrotnej transkrypcji

Wyizolowane RNA (1µg) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy. W reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymywano DNA komplementarne do mRNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników firmy Applied Biosystems w końcowej objętości 20µl.

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)

Zmiany poziomu mRNA genów kodujących następujące białka: kinazę sfingozyny 1 (Sphk1), liazę S1P (SPL), fosfatazę 1 S1P (SPP1), receptory dla S1P (S1PR1 i S1PR3), białka z rodziny Bcl-2 (Bax, Hrk, Bcl-2), enzymy anty-oksydacyjne (SOD2 i GPx-4) oraz β-aktynę analizowano za pomocą reakcji PCR w czasie

rzeczywistym (RT-PCR ang. real-time polymerase chain reaction). Na matrycy cDNA uzyskanej z 1 µg RNA przeprowadzono reakcję RT-PCR przy użyciu odpowiednich sond Taq-Man (Applied Biosystems): *sphk1* Hs01116530_g1, *sphk1* Mn00448841_g1, *sgpl1* Hs00187407_m1, *spp1* Hs00229266_m1, *slpr1* Hs01922614_s1, *slpr3* Hs00245464_s1, *bax* Hs00180269_m1, *bax* Mm00432051_m1, *hrk* Hs02621354_s1, *hrk* Mm01962376_s1, *bcl-2* Hs00608023_m1, *sod2* Hs00167309_m1, *gpx4* Hs0098 9766_g1, *actb* Hs99999903_m1, *actb*-Mm00607939_s1. Poziom mRNA wyrażano jako względny stosunek próbki badanej do próbki referencyjnej (kalibratora), po uprzedniej normalizacji obydwu względem genu referencyjnego (*actb*). Reakcję RT-PCR wykonywano przy pomocy aparatu ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Względny poziom mRNA obliczono metodą $\Delta\Delta Ct$.

Metody immunochemiczne

Immunodetekcja białek metodą Western blot

Immunochemiczną metodą Western blot oznaczano w homogenacie komórkowym (SH-SY5Y) i tkankowym (śródmózgowie i prądkowie myszy) poziom immunoreaktywności białek: Sphk1, kinazy Akt (pSer 473), kinazy Akt całkowitej, Bad (pSer 136), cytochromu c, PARP-1, hydroksylazy tyrozynowej (TH), GAPDH oraz β -aktyny.

Przygotowanie materiału do analizy

Po inkubacji z odpowiednimi związkami komórki na szalkach o średnicy 10 cm płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie zawieszano w 400 µl komercyjnego buforu do lizy firmy Cell Signalling Technology, rozcieńczonego wodą 10-krotnie, o składzie 20 mM Tris-HCl o pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Na₄O₇P₂, 1 mM beta-glicerofosforan disodowy, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptyna. Dodatkowy inhibitor proteaz serynowych - 1 mM fluorek fenylo-metylosulfonylu (PMSF, Cell Signalling Technology) dodawano bezpośrednio przed użyciem buforu. Komórki na szalce inkubowano z buforem 5 minut na lodzie. Lizat zbierano, sonifikowano 10 sekund i wirowano 10 minut przy 14 000 x g w 4°C. Homogenat z komórek, frakcji podkomórkowych oraz tkanki nerwowej mieszano z buforem denaturującym Laemmli o składzie: 62,5 mM Tris-HCl i pH 6,8, 2% SDS, 100

mM DTT, 20% glicerol i 0,2% błękit bromofenolowy. Próbki denaturowano przez 5 minut w temperaturze 95°C.

Rozdział elektroforetyczny i immunodetekcja białek

Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzano w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (siarczanu dodecyłu sodu) – metodą SDS-PAGE (ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). SDS umożliwia rozdział białek ze względu na ich masę cząsteczkową. Dodatek SDS powoduje denaturację białek oraz rozbija wiązania niekowalencyjne. Podczas elektroforezy SDS-PAGE białka o mniejszej masie cząsteczkowej migrują szybciej niż te o większej masie cząsteczkowej. Białka rozdzielano na żelu poliakrylamidowym o odpowiedniej gęstości, w zależności od masy badanego białka. Kolejnym etapem był transfer rozdzielonych białek na błonę nitrocelulozową (Amersham Biosciences) przy użyciu aparatu firmy Bio-Rad (10 V, cała noc w 4°C). Po wykonaniu barwienia białek na błonie za pomocą roztworu Ponceau S, błonę przepłukano w buforze TBS z dodatkiem Tweenu (0,1% TBS-T) i wykonano procedurę detekcji białek, która opiera się na reakcji antygen-przeciwciała. Na początku, celem zablokowania niespecyficznego połączenia przeciwciała, błonę inkubowano w roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA (Sigma – Aldrich), w temperaturze pokojowej przez 60 minut. Następnie błonę inkubowano w roztworze zawierającym odpowiednio rozcieńczone przeciwciało pierwszorzędowe. Specyficzność przeciwciała została potwierdzona przez producenta. W każdym przypadku wynik analizy Western blot był widoczny w postaci jednego prążka na wysokości odpowiadającej masie cząsteczkowej danego białka, wyznaczonej na podstawie markera ciężaru cząsteczkowego białek (Thermo Scientific). W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono interakcji z innymi białkami, niż deklarowane przez producenta. Wyjątek stanowiło białko PARP-1, dla którego wynik analizy Western blot przedstawiał się w postaci dwóch prążków, odpowiadających masie cząsteczkowej 113 kDa oraz 89 kDa, wykrywanych przez przeciwciało monoklonalne (c-2-10, Sigma-Aldrich). Wzrostowi immunoreaktywności niższego prążka (89 kDa) towarzyszyło obniżenie poziomu immunoreaktywności prążka wyższego (113 kDa), co wskazuje że przeciwciało wykrywa zarówno całkowite białko PARP-1 (113 kDa), jak i jego cięty fragment o ciężarze 89 kDa. Warunki inkubacji z przeciwciałami przedstawiono w **tabeli 1**. Nadmiar

przeciwciała opłukiwano 3-krotnie przez 10 minut w buforze TBS-T. W kolejnym etapie dodano przeciwciała II-rzędowe, dodatkowo znakowane peroksydazą chrzanową, skierowane przeciwko przeciwciałom I-rzędowym. Niezwiązane specyficznymi przeciwciałami usuwano, płucząc błony 3-krotnie przez 10 minut w buforze TBS-T. W ostatnim etapie błonę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu zestawu firmowego ECL (Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) i obrazowano przez naświetlanie światłoczułego filmu (Roche Diagnostics). Błony wykorzystane uprzednio inkubowano 30 minut w roztworze 1 % SDS i 50 mM glicyny-HCl o pH 2,0 w celu odmycia związanych przeciwciał i płukano 3 x 15 minut w TBS-T, po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

oznaczane białko	gęstość żelu poliakrylamidowego	warunki blokujące	rozcieńczenie i warunki inkubacji I-rzędowego przeciwciała	rozcieńczenie i warunki inkubacji II-rzędowego przeciwciała
Sphk1	10 %	5% mleko w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	królicze, poliklonalne, przeciw Sphk1, Cell Signalling Technology, rozcieńczenie 1:1000 w 5 % BSA w TBS-T, noc w temp. 4 °C	anty-królicze przeciwciała rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej
hydroksylaza tyrozynowa (TH)	10 %	5% mleko w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	królicze, poliklonalne, przeciw TH, Cell Signalling Technology, rozcieńczenie 1:1000 w 5 % BSA w TBS-T, noc w temp. 4 °C	anty-królicze przeciwciała rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej
pAkt (fosforylowana na Ser 473)	10 %	5% mleko w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	królicze poliklonalne, przeciw pAkt (pSer473), Cell Signalling Technology, rozcieńczone 1:1000 w 5 % BSA w TBS-T, noc w temp. 4 °C	anty-królicze przeciwciała rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej
Akt	10 %	5% mleko w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	królicze poliklonalne, przeciw Akt, Cell Signalling Technology, rozcieńczone 1:2000 w 5 % BSA w TBS-T, noc w temp. 4 °C	anty-królicze przeciwciała rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej
pBAD (fosforylowane na Ser 136)	15 %	5% mleko w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	królicze poliklonalne, przeciw pBAD (pSer136), Cell Signalling Technology, rozcieńczone 1:1000 w 5 % BSA w TBS-T, noc w temp. 4 °C	anty-królicze przeciwciała rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej

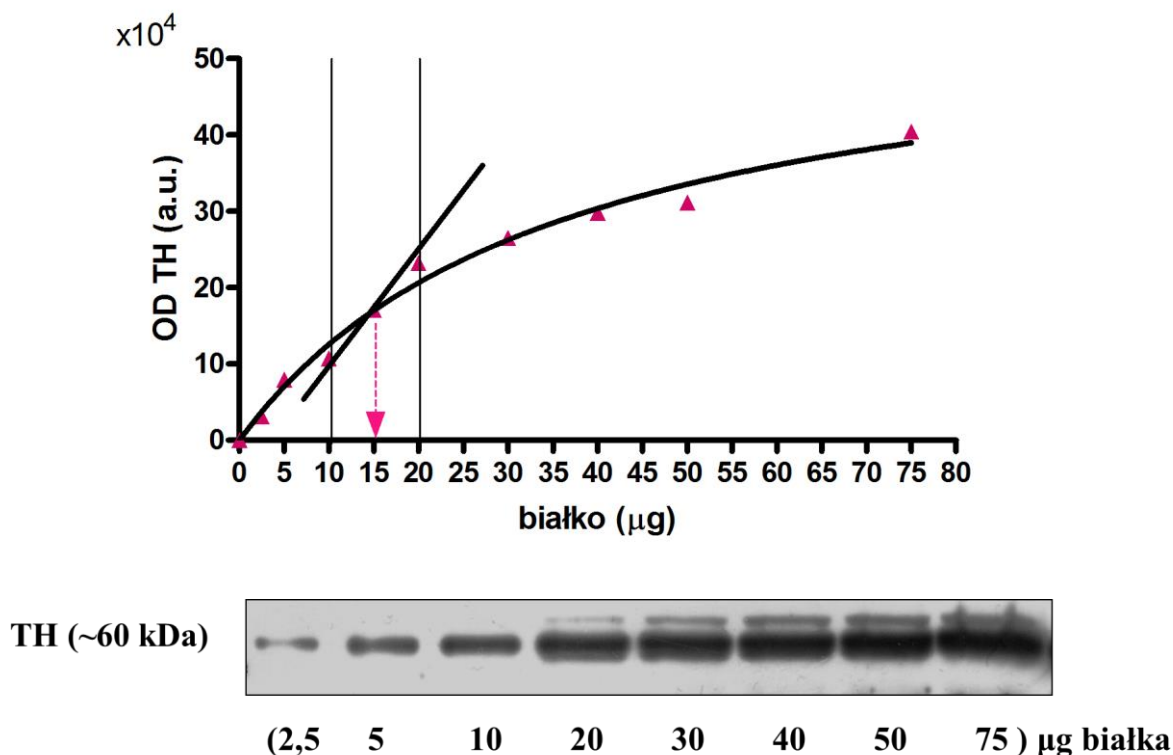
PARP-1	7,5 %	5 % BSA, w PBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	mysie, monoklonalne, przeciw PARP-1 (clon C-2-10), Sigma – Aldrich, rozcieńczone 1:1000 w 5 % BSA w PBS-T, noc w 4 °C	anty-mysie przeciwciało rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej
Cytochrom c	10 %	5 % mleko odtłuszczone, w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	mysie, poliklonalne, przeciw cytochromowi c, Santa Cruz, rozcieńczone 1:500 w 5 % mleku w TBS-T, noc w 4 °C	anty-mysie przeciwciało rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej
GAPDH	10 %	5 % mleko odtłuszczone, w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	królicze, poliklonalne przeciw GAPDH, Sigma- Aldrich, rozcieńczone 1:50000 w 5 % mleku w TBS-T, noc w 4°C lub 1,5 godz. w temp. pokojowej	anty-królicze przeciwciało rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej
aktyna	10 %	5 % mleko odtłuszczone, w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej	mysie, monoklonalne, przeciw aktynie, MP Biomedicals, rozcieńczone 1:1000 w 5 % mleku w TBS-T noc w 4°C lub 3-4 godz. w temp. pokojowej	anty-mysie przeciwciało rozcieńczone 1:4000 w 5 % mleku w TBS-T, 1 godz. w temp. pokojowej

Tabela 1. Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń.

objaśnienia skrótów: TBS-Tween – bufor Tris o składzie 50mM Tris o pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20; BSA - albumina z surowicy bydlęcej (ang. bovine serum albumin)

Produkt reakcji na kliszy, przedstawiający się w postaci prążków, poddawano analizie densytometrycznej przy pomocy oprogramowania TotalLab v1.11. Wielkość i intensywność zaciemnienia danego prążka była proporcjonalna do poziomu immunoreaktywności badanego białka w materiale nałożonym na żel w odpowiedniej ilości. Całkowitą ilość białka z homogenatu komórkowego lub tkanki mózgowej, jaką należy nałożyć na żel poliakrylamidowy dla wyznaczenia relatywnej immunoreaktywności oznaczanego białka, wyznaczono na podstawie krzywych zależności gęstości optycznej od całkowitej ilości nałożonego białka. Kolejno

wyznaczono prostoliniowy zakres uzyskanych wartości i odczytano ilość białka (wartość x), odpowiadającą średniej wartości z zakresu prostoliniowego. Wyznaczoną ilość białka nakładano w doświadczeniach właściwych na żel. Ilości te mieściły się w zakresie 15-40 μg białka. Przykładową krzywą zależności immunoreaktywności dla hydroksylazy tyrozynowej (TH) od całkowitej ilości nałożonego białka przedstawiono poniżej (Rycina 3.)



Rycina 3. Krzywa zależności gęstości optycznej (OD) dla hydroksylazy tyrozynowej (TH) od całkowitej ilości nałożonego na żel białka.

Strzałką oznaczono ilość białka z homogenatu prądkowia, jaka odpowiada średniej wartości powyższej zależności, wyznaczonej z prostoliniowego zakresu krzywej. W przypadku TH jest to 15 μg białka.

Wizualizacja jąder komórkowych i analiza procesu apoptozy przy zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej

Morfologię komórek oraz procent komórek apoptotycznych badano przy użyciu barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (Riedel-de-Haën Germany), który ma zdolność wybarwiania DNA i pozwala na wizualizację kondensacji i agregacji DNA, które są charakterystycznych dla procesu apoptozy. Komórki wysiewano na szalki

o średnicy 35 mm pokryte polietylenoiminą. Po inkubacji z odpowiednimi związkami komórki płukano zimnym buforem PBS, a następnie zalewano 1 ml mrożonego metanolu i utrwalano przez 30 min. w temperaturze -20°C . Barwienie wykonywano poprzez inkubację z barwnikiem Hoechst 33342 w stężeniu 1 ng/ml w buforze fosforanowym przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Kolejno komórki płukano buforem PBS kilkakrotnie. Wybarwione jądra komórkowe analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX71 i fotografowano z użyciem kamery cyfrowej Olympus U-CMAD3 zintegrowanej z mikroskopem przy długości fali pobudzającej 340nm i emitowanej 510nm, przy użyciu 40-krotnego powiększenia.

Analiza aktywności motorycznej

Test otwartego pola

Zachowania eksploracyjne, spontaniczny napęd ruchowy i poziom lęku badano w okrągłym polu o średnicy 60 cm i białym podłożu. Test przeprowadzono w jedenastym dniu eksperymentu. Każda mysz została umieszczona w centrum pola, a jej aktywność badana była przez 15 minut. Kamera rejestrowała zachowania zwierząt, a odpowiedni program Ethovision XT 11.5 software (Noldus, Wageningen, The Netherlands) wyliczał parametry: całkowity przebyty dystans (cm), całkowity czas przebywania w strefie centralnej/peryferyjnej (sec), ilość wejść do strefy centralnej/peryferyjnej, całkowity czas lokomocji/bezruchu (sec). Wykresy przedstawiają dynamikę zmian w ciągu 15 min. eksperymentu i zawierają uśrednione dla danej grupy badawczej wartości powyższych parametrów w każdej minucie eksperymentu.

Test Rotarod

Wymuszona aktywność motoryczna (koordynacja ruchowa, równowaga i sztywność kończyn) mierzona była testem Rotarod, wykonanym w dwunastym oraz kolejnych dwóch dniach eksperymentu, licząc od ostatniej iniekcji MPTP. W teście tym myszy zostały umieszczone na poziomo zorientowanym, obrotowym cylindrze o średnicy 3 cm, zawieszonym 20 cm nad podłogą klatki. Obroty cylindra zaprogramowano tak, aby obracał się on z liniowo wzrastającą prędkością od 1 do 40 obrotów na minutę w czasie 300 sekund. Zwierzęta starały się utrzymać na obrotowym walcu i uniknąć upadku na ziemię z wysokości pozwalającej na bezpieczny upadek. Automatyczne czujniki

wyłączały się kiedy zwierzę dotknęło podłogi. W doświadczeniu liczył się maksymalny czas przebywania zwierzęcia na walcu obrotowym (do momentu upadku lub przekroczenia czasu 300 sekund). Każda mysz została poddana 3 próbom z 15-minutowym odstępem między próbami przez 3 kolejne dni eksperymentu (łącznie 9 prób dla każdej myszy). Wyniki przedstawiono jako całkowity czas przebywania na obrotowym walcu (sec), uśredniony dla danej grupy badawczej.

Statystyczne opracowanie wyników

Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano testem t-Studenta (dla porównania ze sobą dwóch grup badawczych), a także jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testu porównań wielokrotnych Newmana-Keuls'a (dla porównania średnich z kilku układów doświadczalnych) lub testu Bonferroni dla porównań par średnich. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.

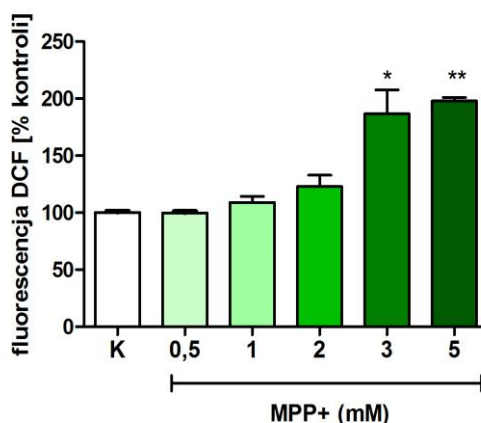
Wyniki

Badania In vitro

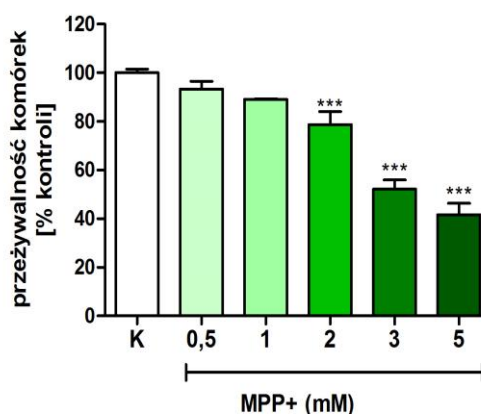
1) Wpływ MPP⁺ na indukcję stresu oksydacyjnego oraz żywotność komórek SH-SY5Y

Celem pracy było zbadanie udziału kinaz sfingozyny (Sphk1/2) w mechanizmie śmierci komórek nerwowych w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP⁺ oraz w wybranych częściach mózgu myszy poddanych iniekcji MPTP. Pierwszy etap (*in vitro*) stanowił cykl doświadczeń z użyciem ludzkiej linii komórkowej *neuroblastoma* SH-SY5Y, poddanej inkubacji z neurotoksyną MPP⁺, która jest powszechnym modelem badań zaburzeń molekularnych obserwowanych w ChP, co zostało szczegółowo uzasadnione w części Materiały i Metody. Z danych literaturowych oraz przeprowadzonych wcześniej badań (Pyszko i Strosznajder 2014a; Pyszko i Strosznajder 2014b) wiadomo, że toksyna MPP⁺ generuje w komórkach stres oksydacyjny. Inkubacja komórek SH-SY5Y z MPP⁺ zwiększa w sposób zależny od stężenia toksyny poziom wolnych rodników (WR), mierzony metodą spektrofluorymetryczną przy użyciu sondy DCF (**Rycina 4A.**). Przy efektywnym stężeniu równym ~ 3 mM odnotowano dwukrotny wzrost poziomu WR. Zmianom tym towarzyszyło zależne od stężenia MPP⁺ obniżenie żywotności komórek SH-SY5Y, co wykazano testem MTT oraz metodą wizualizacji jąder komórkowych barwionych Hoechst 33342. Przy zastosowaniu stężenia MPP⁺ LC₅₀ ~ 3 mM dochodziło do 50% obniżenia żywotności komórek SH-SY5Y (**Rycina 4B.**). Analiza komórek w mikroskopie fluorescencyjnym wykazała, że 24-godzinna inkubacja z 3 mM MPP⁺ powodowała zmiany morfologiczne charakterystyczne dla procesu apoptozy tj. kondensację i fragmentację chromatyny, obecność jąder pyknotycznych oraz tworzenie ciałek apoptotycznych. Obliczono procent komórek apoptotycznych w populacji kontrolnej i traktowanej MPP⁺ i wykazano kilkukrotny wzrost procentu apoptozy po inkubacji z 3 mM MPP⁺ (**Rycina 4C.**).

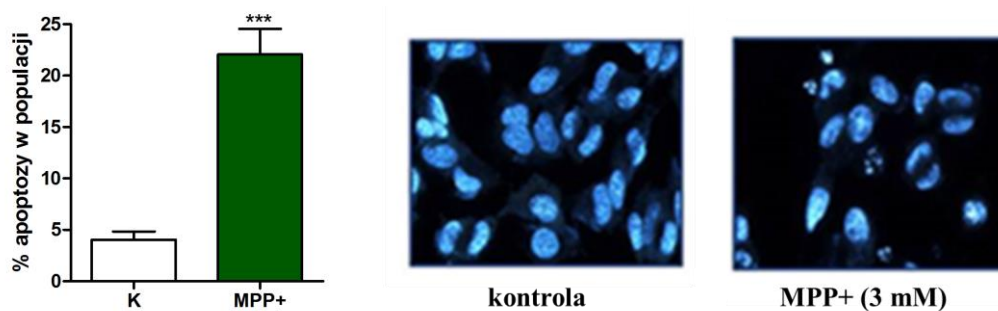
A



B



C



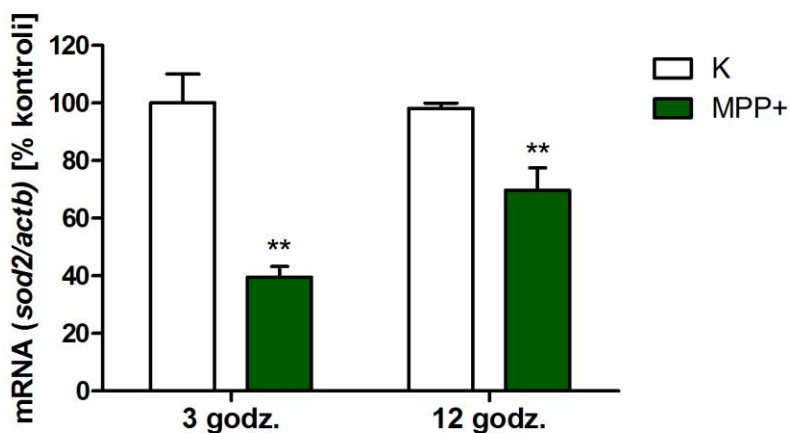
Rycina 4. Wpływ 24-godzinnej inkubacji komórek SH-SY5Y z MPP+ na poziom wolnych rodników i żywotność komórek SH-SY5Y.

Komórki SH-SY5Y inkubowano z MPP+(0,5-5 mM) przez 24 godz. Wykresy przedstawiają wyniki analizy poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF (A) oraz analizy żywotności komórek, wykonanej metodą testu MTT (B) i wizualizacji jąder komórkowych przy użyciu barwnika Hoechst 33342 (C). Wyniki wykresów A i B stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń w czterech-sześciu powtórzeniach \pm SEM. Wyliczenia procentu apoptozy

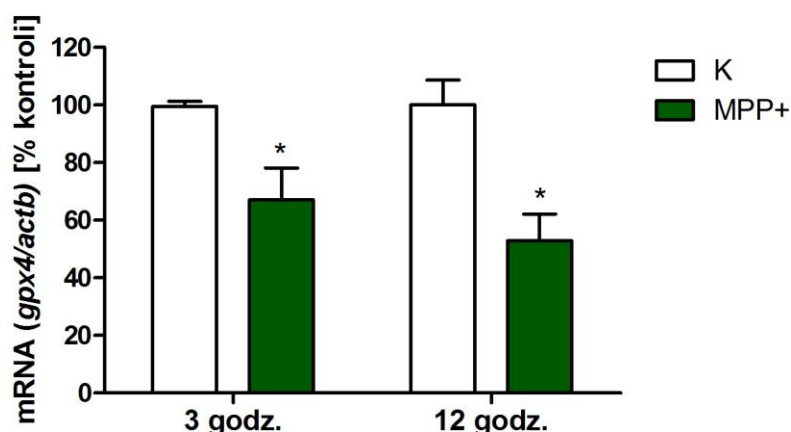
dokonano na podstawie zdjęć z trzech niezależnych doświadczeń, gdzie dla każdego układu badawczego wykonano cztery powtórzenia, które obserwowano w pięciu polach widzenia. Procent apoptozy w populacji oznacza procent liczby komórek o cechach apoptotycznych w całej populacji danego układu badawczego. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM. Do oceny statystycznej zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa (A,B) oraz test-t Studenta (C), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach).

Kolejną analizą ekspresji genów w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu 3 mM MPP+ w czasie 3-12 godzin wykazała obniżenie poziomu mRNA enzymów antyoksydacyjnych: mitochondrialnej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (mtSOD, gen kodujący *sod2*) oraz peroksydazy wodoronadtlenków fosfolipidowych (GPx-4, gen kodujący *gpx4*), występującej w mitochondriach i cytoplazmie. Ekspresja *sod2* po 3 godz. inkubacji z MPP+ malała do 40%, a następnie wzrastała do 70% wartości kontrolnej (**Rycina 5A.**), natomiast ekspresja *gpx4* wykazywała obniżenie poziomu mRNA zależne od czasu inkubacji z MPP+ (**Rycina 5B.**).

A



B



Rycina 5. Poziom mRNA *sod2* i *gpx4* w komórkach poddanych działaniu MPP+.

Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 3 godz. i 12 godz. z 3 mM MPP+. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genu *sod2* (A) i *gpx4* (B) metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki normalizowane są względem β -aktyny (*actb*). Każdy z nich stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach).

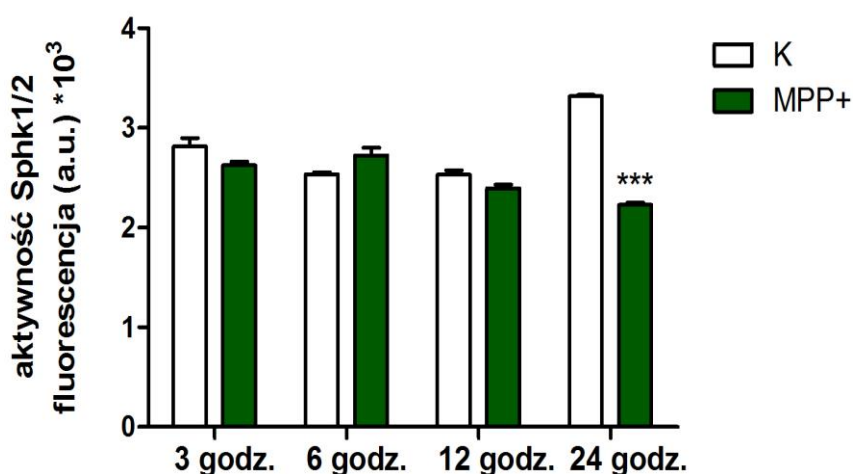
2) Udział kinaz sfingozyny (*Sphk1/2*) w mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP+

2.1) Poziom aktywności *Sphk1/2* w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+

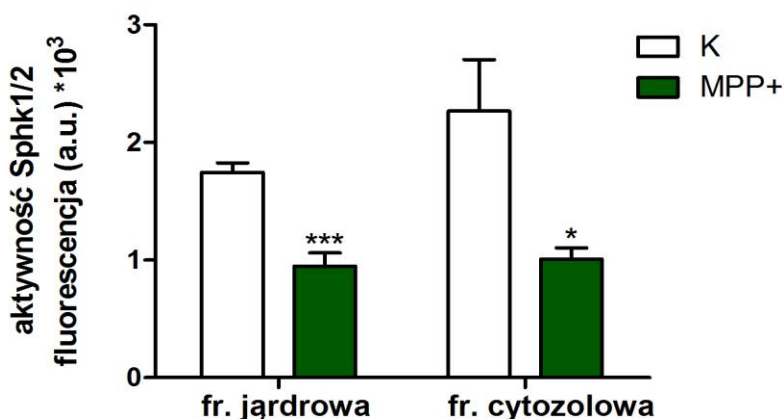
Sphk1/2 są enzymami, których aktywność w dużej mierze zależy od potencjału redox komórki. Indukcja stresu oksydacyjnego prowadzić może do zmniejszenia aktywności kinaz. Z drugiej strony sama inhibicja *Sphk1/2* generować może stres oksydacyjny. Zbadano zatem poziom aktywności *Sphk1/2* w komórkach SH-SY5Y po 24-godzinnym działaniu 3 mM MPP+. Zastosowano metodę spektrofluorymetryczną z użyciem znakowanej sfingozyny (NBD-Sph), będącej substratem dla *Sphk1/2*. Sposób przeprowadzenia pomiaru i kalkulacja zostały przedstawione w rozdziale Materiały i Metody. Wykazano, że w trakcie 24-godzinnej inkubacji z 3 mM MPP+ poziom aktywności całkowitej *Sphk1/2* w homogenacie komórkowym ulegał obniżeniu do 70% wartości kontrolnej (**Rycina 6A.**). Stosując warunki inkubacyjne optymalne dla pomiaru aktywności *Sphk2* i *Sphk1*, zmierzono aktywność poszczególnych enzymów w zgrubnej

frakcji jądrowej i cytozolowej, w których w głównej mierze występują odpowiednio Sphk2 oraz Sphk1. Ponadto reakcja enzymatyczna prowadzona była w dwóch oddzielnych buforach inkubacyjnych. Bufor do oznaczania aktywności Sphk1 wzbogacony był o niejonowy detergent - Triton X-100, który hamuje Sphk2, natomiast bufor do oznaczania aktywności Sphk2 zawierał wysokie stężenie soli nieorganicznych (0,5 M KCl), które ma hamujący efekt na Sphk1. Aktywność enzymów mierzona we frakcji jądrowej i cytozolowej ulegała obniżeniu odpowiednio do 50% oraz 45% wartości kontrolnej w powyższym modelu stresu oksydacyjnego (**Rycina 6B.**). Wyniki te sugerują, że zaburzenie aktywności Sphk1/2 może odgrywać istotną rolę w mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+.

A



B



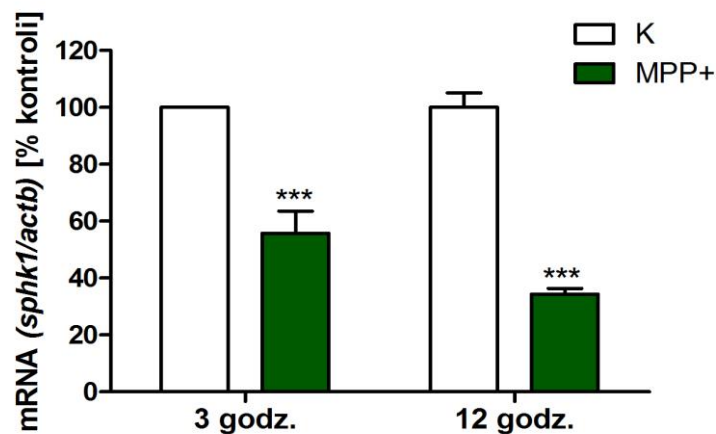
Rycina 6. Aktywność całkowita Sphk1/2 w homogenacie komórkowym oraz w zgrubnej frakcji jądrowej i cytozolowej.

Komórki SH-SY5Y inkubowano z 3 mM MPP+ przez 3-24 godz (A) lub 24 godz (B). Wykresy przedstawiają pomiar aktywności całkowitej Sphk1/2 w homogenacie komórkowym (A) oraz aktywności Sphk2 i Sphk1 odpowiednio w zgrubnej frakcji jądrowej i cytozolowej (B), wykonany metodą pomiaru fluorescencji NBD-S1P. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta, * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach).

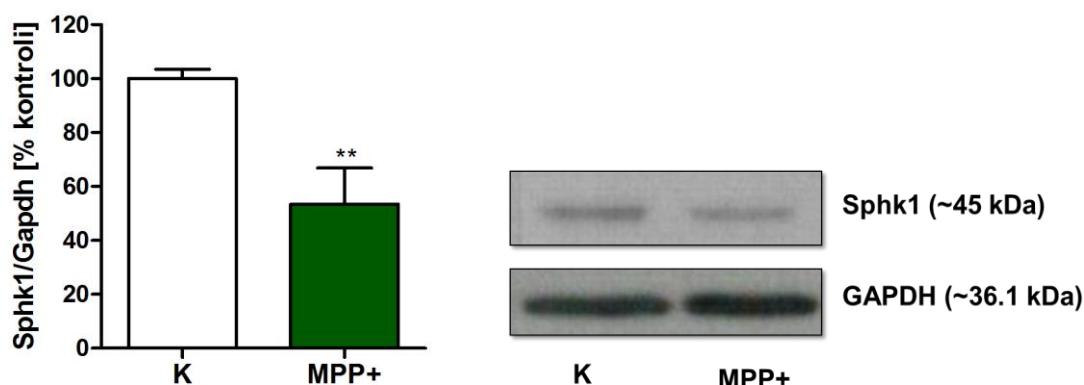
2.2) Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego MPP+ na ekspresję genu/poziom białka Sphk1 w komórkach SH-SY5Y

Jak zaznaczono we wstępie, izoforma pierwsza (Sphk1) w głównej mierze odpowiada za syntezę puli S1P działającej w mechanizmie zależnym od pobudzenia receptorów, który jest weryfikowany w dalszej części niniejszej rozprawy. W związku z powyższym w dalszych etapach badano tę właśnie izoformę. Analiza ekspresji genu wykazała zależne od czasu inkubacji z MPP+ obniżenie poziomu mRNA *sphk1* w komórkach SH-SY5Y. Znamionemu obniżeniu ulegał także poziom immunoreaktywności enzymu Sphk1 po 24-godzinym działaniu MPP+ (**Rycina 7**).

A



B

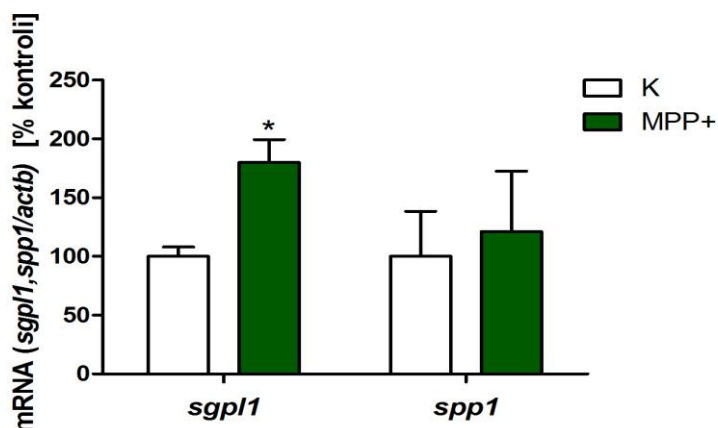


Rycina 7. Poziom ekspresji genu i immunoreaktywności białka Sphk1 w komórkach poddanych działaniu MPP+.

Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 3, 12 godz. (A) oraz 24 godz. (B) z 3 mM MPP+. Poziom ekspresji genu *sphk1* badano metodą PCR w czasie rzeczywistym i normalizowano względem β -aktyny (*actb*) (A). Immunoreaktywność Sphk1 badano metodą Western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH (B). Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach). Obok wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

2.3) Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego MPP+ na poziom ekspresji fosfatazy S1P i liazy S1P

Poziom S1P w prawidłowej komórce utrzymywany jest na stałym poziomie dzięki równowadze między działaniem enzymów odpowiedzialnych za syntezę tego aktywnego lipidu oraz za jego degradację. W tym drugim procesie zaangażowane są fosfatazy S1P, głównie fosfataza S1P 1 (SPP1, gen kodujący *spp1*), która defosforuluje S1P do Sph oraz liaza S1P (SPL, gen kodujący *sgpl1*), która nieodwracalnie degraduje ten aktywny sfingolipid do fosforanu etanolaminy i heksadecenal. Wykazano, że 12-godzinna inkubacja z MPP+ nie wpływa na poziom mRNA dla fosfatazy *spp1*, jednak znamienne podwyższa poziom mRNA liazy *sgpl1* w komórkach SH-SY5Y, co wraz z hamowaniem ekspresji i aktywności Sphk1 prowadzić może do obniżenia poziomu S1P w komórce (Rycina 8).



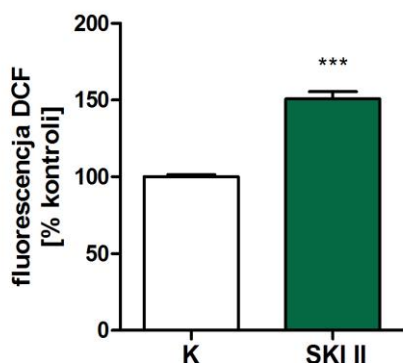
Rycina 8. Poziom ekspresji *sgpl1* i *spp1* w komórkach poddanych działaniu MPP+.

Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 12 godz. z 3 mM MPP+. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genu *sgpl1*, *spp1* metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wynik normalizowany względem β -aktyny (*actb*) stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta. * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach).

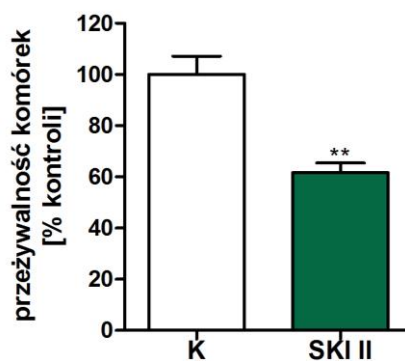
2.4) Rola inhibicji Sphk1 w indukcji stresu oksydacyjnego i śmierci komórek SH-SY5Y

W pierwszej części badań wykazano, że indukcja stresu oksydacyjnego prowadzi do hamowania ekspresji/aktywności Sphk1. Zmiany te mogą kolejno pogłębiać stres oksydacyjny w komórce, prowadząc do błędnego koła zdarzeń aktywujących oksydacyjne procesy w komórce. W związku z powyższym, w kolejnych doświadczeniach zastosowano farmakologiczną inhibicję Sphk1. Komórki traktowano selektywnym inhibitorem Sphk1 - 2-(p-hydroksyanilino)-4-(p-chlorofenylo)tiazolem (SKI II) w stężeniu 5 μ M i badano wpływ inhibicji Sphk1 na wybrane szlaki sygnalizacyjne, regulujące procesy przeżycia/śmierci komórki. Wykazano, że 24-godzinna inkubacja komórek z SKI II powodowała 50% wzrost poziomu wolnych rodników (**Rycina 9A.**). Zjawisku temu towarzyszyło 50% obniżenie żywotności komórek SH-SY5Y (**Rycina 9B.**).

A



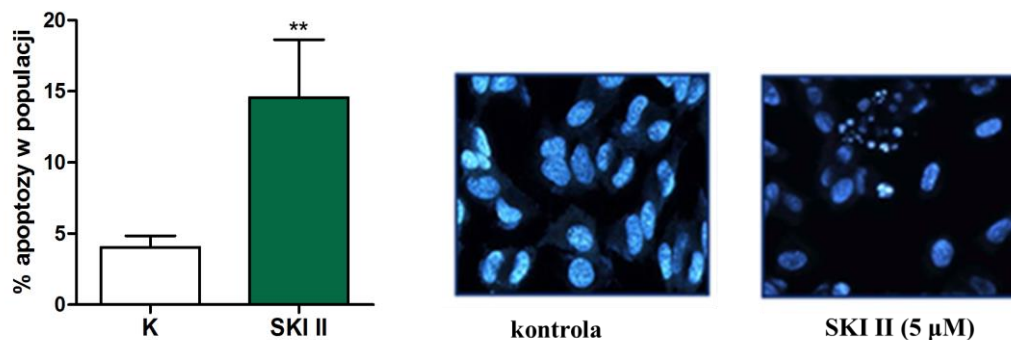
B



Rycina 9. Wpływ inhibitora Sphk1 (SKI II) na poziom wolnych rodników oraz żywotność komórek SH-SY5Y.

Komórki SH-SY5Y poddawane były 24 godzinnej inkubacji z 5 μ M SKI II. Wykresy przedstawiają wyniki analizy poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF (A) oraz analizy żywotności komórek, wykonanej metodą testu MTT (B). Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech-sześciu powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-*t* Studenta. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez SKI II, ale w tych samych warunkach).

Następnie za pomocą barwnika Hoechst 33342 wykonano wizualizację jąder komórkowych i ich weryfikację pod kątem cech apoptotycznych w warunkach inhibicji Sphk1. Analiza w mikroskopie fluorescencyjnym wykazała, że 24-godzinna inkubacja z SKI II (5 μ M) powoduje wzrost liczby komórek apoptotycznych. Zaobserwowano zmiany morfologiczne charakterystyczne dla procesu apoptozy: kondensację chromatyny oraz tworzenie ciałek apoptotycznych (**Rycina 10.**).

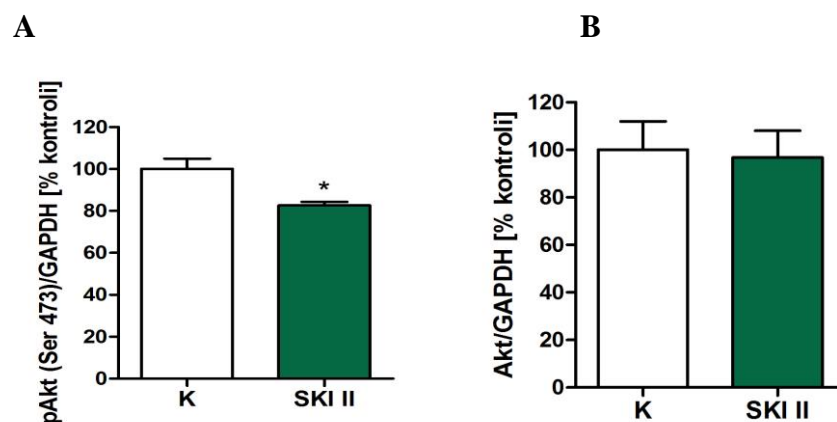


Rycina 10. Apoptoza w komórkach SH-SY5Y po 24 godz. inkubacji z SKI II.

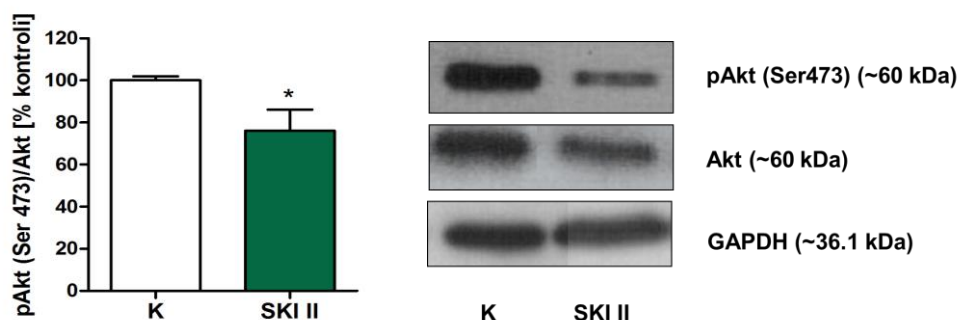
Komórki SH-SY5Y poddawane były 24 godzinnej inkubacji z 5 μ M SKI II. Po 24 godz. ekspozycji komórek SH-SY5Y wykonano barwienie sondą fluorescencyjną Hoechst 33342. Wyliczenia procentu apoptozy dokonano na podstawie zdjęć z trzech niezależnych doświadczeń, gdzie dla każdego układu badawczego wykonano cztery powtórzenia, które obserwowanego w pięciu polach widzenia. Procent apoptozy w populacji oznacza procent liczby komórek o cechach apoptotycznych w całej populacji danego układu badawczego. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test t-Studenta. $**p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez SKI II ale w tych samych warunkach).

2.5) Zbadanie poziomu fosforylacji/aktywności kinazy Akt w warunkach farmakologicznej inhibicji Sphk1

Serynowo-treoninowa kinaza Akt, która jest sprzężona z PI3 kinazą odpowiada za fosforylację wielu białek związanych z regulacją kluczowych procesów takich jak: transkrypcja, proliferacja czy apoptoza komórki. Kinaza ta jest też kluczowym białkiem efektorowym szlaków zależnych od pobudzenia receptorów dla S1P – produktu syntezy Sphk1. Wszystkie izoformy kinazy Akt (Akt1, Akt2 i Akt3) wymagają aktywacji poprzez fosforylację reszt seryny w pozycji 473 w C-terminalnej domenie regulatorowej. Zbadano poziom fosforylacji kinazy Akt (Ser 473) w warunkach inhibicji Sphk1. Stwierdzono, że 24-godzinna inkubacja komórek SH-SY5Y z SKI II (5 μ M) powoduje obniżenie poziomu fosforylacji kinazy Akt na Ser 473. Poziom immunoreaktywności całkowitej kinazy Akt nie ulega zmianie w warunkach inkubacji z SKI II. Stosunek formy ufosforylowanej do całkowitej (pAkt/Akt) ulega znamiennej obniżeniu w stresie wywołanym SKI II, przyczyniając się tym samym do zahamowania aktywności tej kinazy (Rycina 11.).



C



Rycina 11. Poziom immunoreaktywności kinazy Akt ufosforylowanej na Ser 473 w warunkach inhibicji Sphk1.

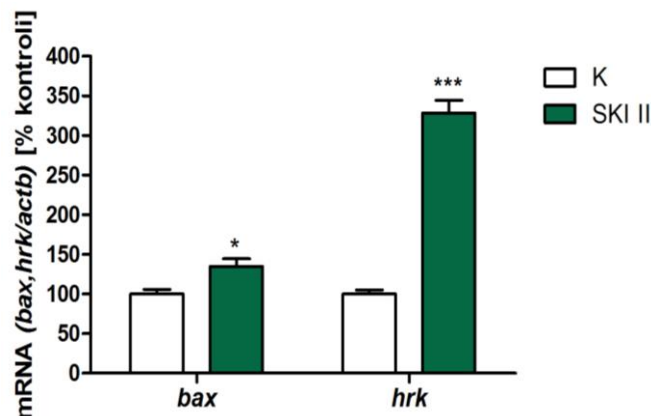
Komórki SH-SY5Y inkubowane były 24 godz. z 5 μ M SKI II. Immunoreaktywność kinazy Akt badano metodą Western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej, przedstawiony jako iloraz pAkt (Ser 473) do GAPDH (A), Akt do GAPDH (B) oraz pAkt (Ser 473)/Akt (C), który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test t-Studenta. * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez SKI II, ale w tych samych warunkach). Obok wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

2.6) Analiza zmian molekularnych, znamienych dla procesu apoptozy w komórkach SH-SY5Y traktowanych SKI II i MPP+

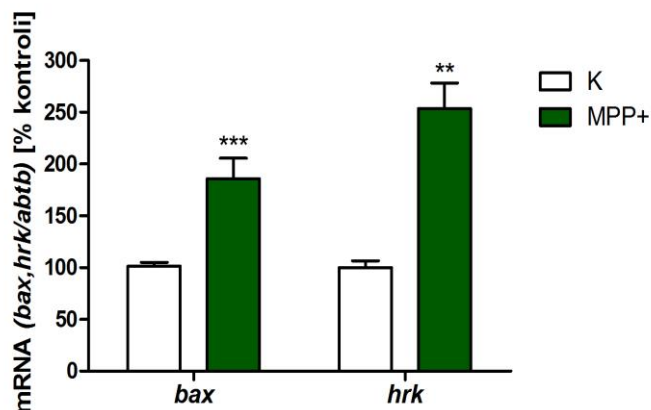
Dotychczasowe wyniki wykazały śmierć komórek na drodze apoptozy w warunkach stresu oksydacyjnego, wywołanego zarówno MPP+, jak i inhibicją Sphk1. Postawiono zatem pytanie: Czy w mechanizmie obumierania komórek SH-SY5Y wywołanym MPP+ oraz SKI II zachodzą te same zmiany molekularne. Kluczową rolę regulacyjną w procesie przeżycia/śmierci komórki pełnią białka z rodziny Bcl-2. Zbadano zatem wpływ SKI II i MPP+ na ekspresję dwóch pro-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2: Hrakiri (Hrk, gen kodujący *hrk*) oraz białka Bax (gen kodujący *bax*). Bax reprezentuje podrodzinę białek efektorowych apoptozy, które uwolnione z kompleksów z białkami anty-apoptotycznymi Bcl-2, zwiększają przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej dla pro-apoptotycznych białek m.in. cytochromu c. Hrk należy do podrodziny „BH3-only”, których podstawową funkcją jest indukcja apoptozy poprzez wypieranie białek efektorowych typu Bax z kompleksów z białkami anty-apoptotycznymi. Wybór białka Hrk podyktowany był faktem, że komórki układu nerwowego w odpowiedzi na niski poziom NGF, wykazują wysoką ekspresję tego białka.

Ekspresja obydwu białek (*bax* i *hrk*) regulowana jest głównie na poziomie transkrypcji. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała wzrost poziomu mRNA obydwu białek pro-apoptotycznych w warunkach 12-godzinnej inkubacji komórek SH-SY5Y z 5 μ M SKI II i 3 mM MPP+, przy czym wyższy poziom mRNA w przypadku obydwu stresorów stwierdzono dla *hrk*. SKI II trzykrotnie zwiększa poziom mRNA *hrk*, podczas gdy mRNA *bax* wzrasta do 130 % wartości kontrolnej (**Rycina 12A.**). W przypadku stresu wywołanego MPP+ ekspresja *bax* i *hrk* zwiększa się odpowiednio dwukrotnie i trzykrotnie w stosunku do komórek kontrolnych (**Rycina 12B.**).

A



B



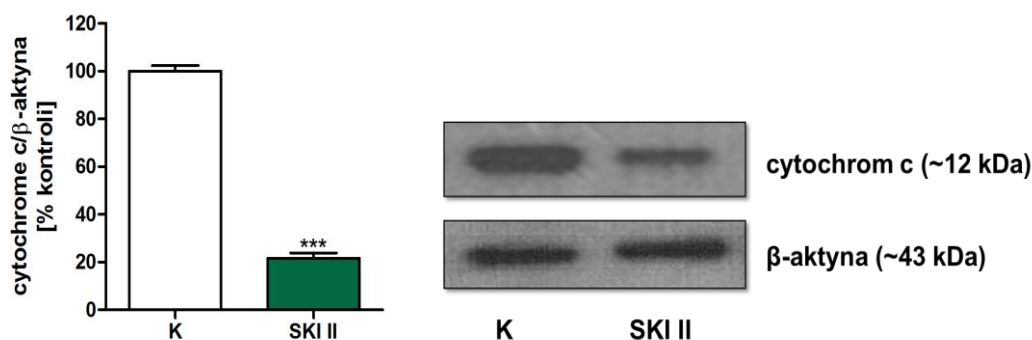
Rycina 12. Poziom mRNA genów pro-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (*bax* i *hrk*) w komórkach SH-SY5Y w warunkach farmakologicznej inhibicji Sphk1 oraz stresu wywołanego MPP+.

Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 12 godz. z 5 μ M SKI II (A) lub 3 mM MPP+ (B). Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wynik normalizowany względem β -aktyny (*actb*) stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej

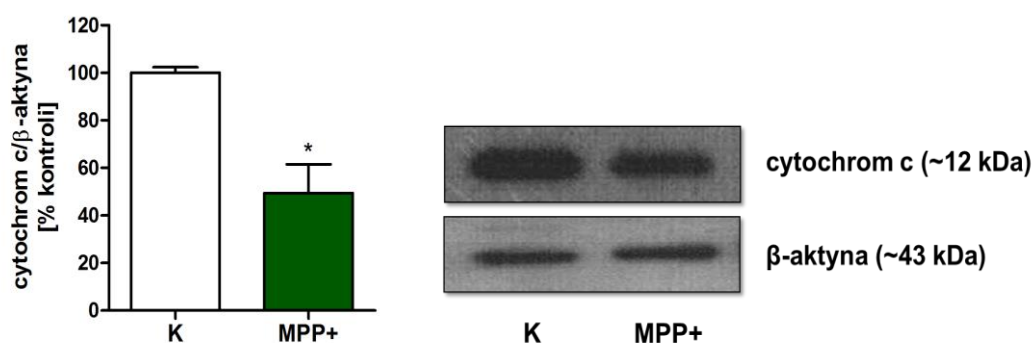
wyników zastosowano test *t*-Studenta. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez SKI II i MPP+, ale w tych samych warunkach).

Wzrost ekspresji powyższych białek sugerować może wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej dla cytochromu *c*, którego translokacja z mitochondrium do cytozolu jest istotnym markerem apoptozy. Zbadano poziom immunoreaktywności cytochromu *c* w zgrubnej frakcji mitochondrialnej w komórkach SH-SY5Y poddanych 24-godzinnej inkubacji z SKI II (5 μ M) i MPP+ (3 mM). Analiza Western blot wykazała pięciokrotne i dwukrotne względem poziomu kontrolnego obniżenie immunoreaktywności cytochromu *c* we frakcji mitochondrialnej odpowiednio w warunkach hamowania aktywności Sphk1 i stresu wywołanego MPP+ (**Rycina 13.**).

A



B

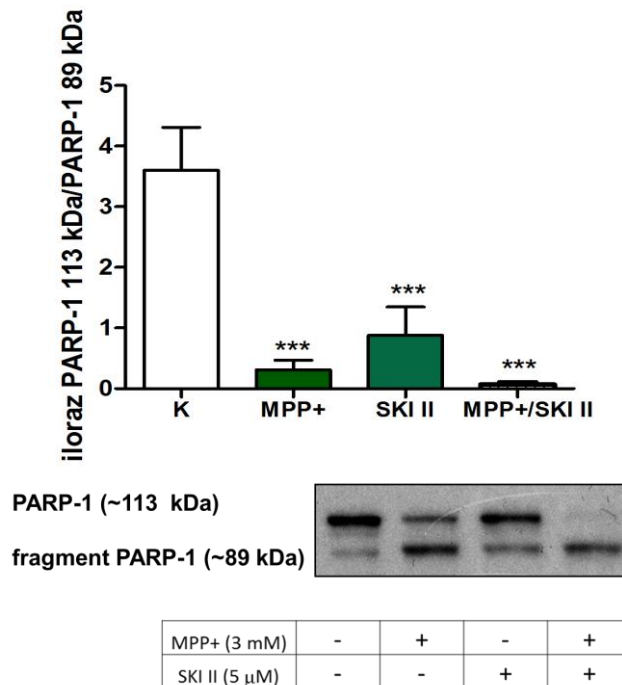


Rycina 13. Poziom immunoreaktywności cytochromu *c* w zgrubnej frakcji mitochondrialnej komórek SH-SY5Y w warunkach inhibicji Sphk1 oraz stresu wywołanego MPP+.

Komórki SH-SY5Y inkubowane były 24 godz. z 5 μ M SKI II (A) lub 3 mM MPP+(B). Immunoreaktywność cytochromu *c* badano metodą Western blot w w zgrubnej frakcji mitochondrialnej. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyny (*actb*), stanowiący średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-*t* Studenta.

* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+ lub SKI II, ale w tych samych warunkach). Obok wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

Kolejno zbadano poziom immunoreaktywności jądrowego enzymu polimerazy poli(ADP-rybozy) PARP-1, o masie cząsteczkowej 113 kDa z równoczesnym poziomem immunoreaktywności jej fragmentu o ciężarze 89 kDa. W przebiegu apoptozy PARP-1 jest substratem dla wykonawczej kaspazy-3. W domenie lokalizacji jądrowej PARP-1 znajduje się sekwencja aminokwasowa DEVD, która stanowi miejsce cięcia dla tej kaspazy. Powstały fragment o masie cząsteczkowej 89 kDa uznawany jest za marker apoptotycznej śmierci komórki. W niniejszej pracy wykazano, że zarówno stres wywołany MPP+, jak i farmakologiczna inhibicja Sphk1, powodują obniżenie immunoreaktywności PARP-1 (113 kDa) oraz jednoczesny wzrost immunoreaktywności fragmentu o ciężarze 89 kDa, co wskazywać może na degradację polimerazy PARP-1. Łączne zastosowanie obydwu związków (3 mM MPP+ i 5 μ M SKI II) prowadzi do silniejszego wzrostu poziomu immunoreaktywności fragmentu 89 kDa, któremu towarzyszy obniżenie całkowitej PARP-1, której poziom jest w tych warunkach niemal niewykrywalny (Rycina 14.).



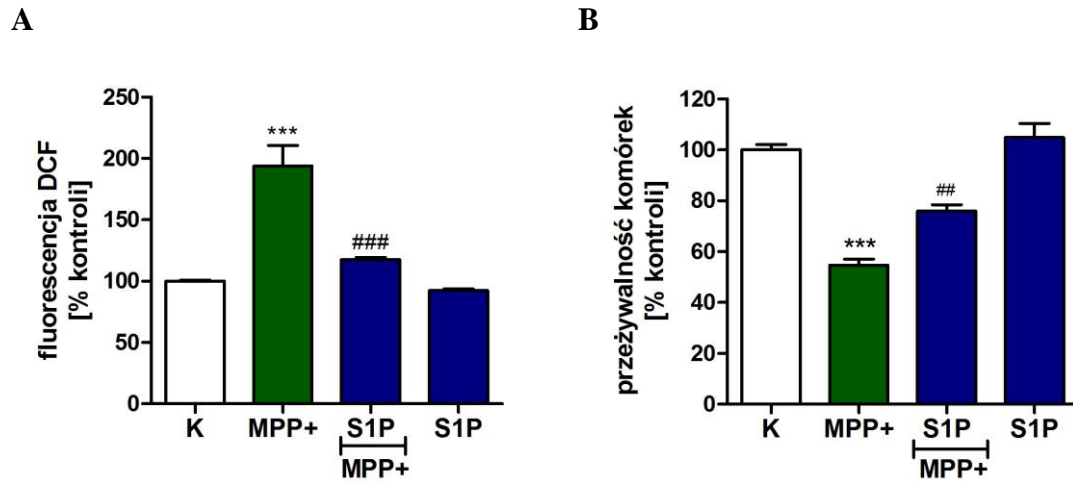
Rycina 14. Poziom immunoreaktywności PARP-1 (113 kDa) oraz jej fragmentu o ciężarze 89 kDa w warunkach inhibicji Sphk1 i stresu wywołanego MPP+ w komórkach SH-SY5Y.

Komórki SH-SY5Y inkubowane były 24 godz. z MPP+(3 mM), SKI II (5 μ M) lub obydwoma związkami jednocześnie. Immunoreaktywność PARP-1 badano metodą Western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej stanowiący iloraz immunoreaktywności formy całkowitej (113 kDa) do fragmentu o ciężarze 89 kDa, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+ lub SKI II, ale w tych samych warunkach). Obok wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

3) Zbadanie roli egzogenego sfingozyno-1-fosforanu (S1P) w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP+

3.1) Analiza wpływu egzogenego S1P na poziom stresu oksydacyjnego oraz żywotność komórek SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+

W modelu neurotoksycznego działania MPP+ zbadano rolę produktu enzymatycznej reakcji Sphk1 – egzogenego sfingozyno-1-fosforanu (S1P). S1P dodawano do komórek na godzinę przed potraktowaniem ich MPP+. Wykazano, że egzogeny S1P w stężeniu 1 μ M ma znamienne działanie antyoksydacyjne, wyrażone jako dwukrotne obniżenie poziomu WR w komórkach SH-SY5Y traktowanych 24 godz. 3 mM MPP+ (**Rycina 15A.**). Kolejną analizą żywotności komórek metodą testu MTT wykazała znamienne kilkunastoprocentowy wzrost żywotności komórek SH-SY5Y traktowanych MPP+, poddanych pre-inkubacji z S1P (1 μ M) (**Rycina 15B.**). Zastosowanie wyższych stężeń S1P nie wpływało na wzrost liczby aktywnych metabolicznie komórek, mierzonej testem MTT. Stężenie 1 μ M było najniższym efektywnym stężeniem, które zwiększało w sposób znamienne żywotność komórek, traktowanych MPP+. Jest ono jednocześnie stężeniem porównywanym do fizjologicznego w tkankach OUN.



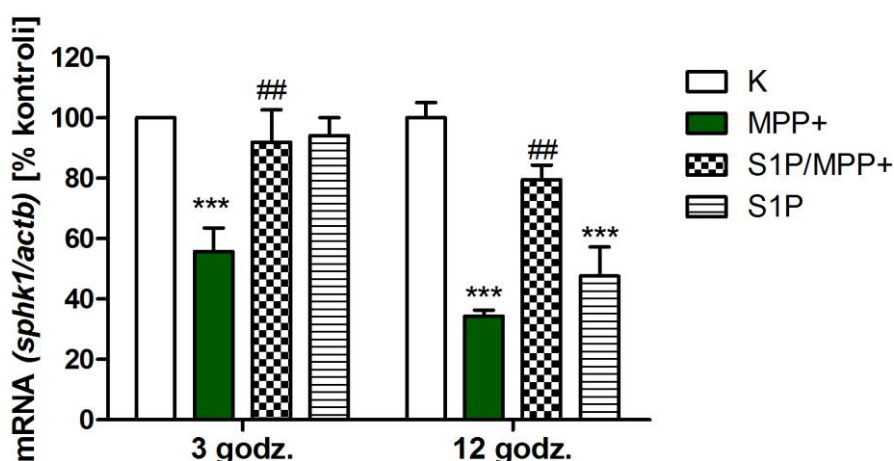
Rycina 15. Wpływ S1P na poziom wolnych rodników (A) oraz żywotność komórek SH-SY5Y (B) w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem MPP+.

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z S1P (1 μ M), a następnie traktowane MPP+(3 mM) przez 24 godz. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń w czerech do sześciu powtórzeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** p <0,001 – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach), ## p <0,01 ### p <0,001 – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MPP+.

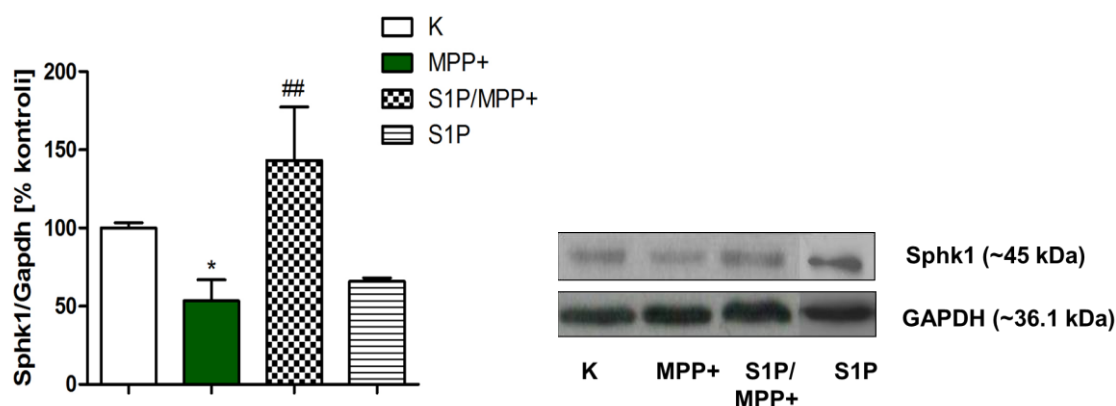
3.2) Wpływ S1P na ekspresję Sphk1 oraz białek pro-apoptotycznych z rodziny Bcl-2

W kolejnym etapie zbadano, czy za mechanizm protekcyjnego działania egzogenego S1P może odpowiadać jego wpływ na poziom ekspresji Sphk1, która ulega obniżeniu w warunkach stresu wywołanego MPP+. Wykazano, że S1P (1 μ M) znacząco podwyższa poziom mRNA *sphk1* w warunkach 3 i 12-godzinnej inkubacji z 3 mM MPP+ oraz immunoreaktywność białka w warunkach 24-godzinnej inkubacji z MPP+. Jednocześnie poziom mRNA *sphk1* mierzony w kontrolnych komórkach traktowanych samym S1P w czasie 12 godz. ulega znamienemu obniżeniu (**Rycina 16**).

A



B



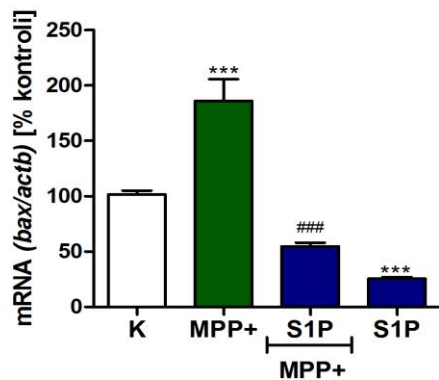
Rycina 16. Wpływ S1P na ekspresję genu i immunoreaktywność Sphk1 w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem MPP+.

Komórki SH-SY5Y poddane były 1 godzinnej pre-inkubacji z S1P (1 μ M), a następnie traktowane MPP+ (3 mM) przez 3, 12 godz. (A) i 24 godz. (B). Poziom ekspresji genu *sphk1* badano metodą PCR w czasie rzeczywistym i normalizowano względem β -aktyny (*actb*) (A). Immunoreaktywność Sphk1 badano metodą Western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH (B). Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach), ## $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MPP+. Poniżej wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

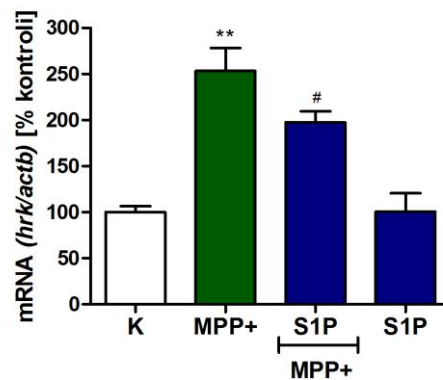
W kolejnym etapie wykazano, że egzogeny S1P (1 μ M) znamienne obniża poziom mRNA pro-apoptycznych białek *bax* i *hrk* w warunkach 24-godzinnej inkubacji

z 3 mM MPP+ (**Rycina 17 A,B.**). Znacznie silniej wyrażone jest hamowanie ekspresji białka Bax, która maleje trzykrotnie w stosunku do ekspresji w komórkach traktowanych MPP+. Ponadto inkubacja komórek z samym S1P prowadzi do znamiennego obniżenia ekspresji białka Bax w stosunku do komórek kontrolnych. Niespodziewanie, w warunkach stresu wywołanego MPP+ w komórkach SH-SY5Y podwyższeniu ulega poziom ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-2, co jest jednak zgodne z licznymi danymi literaturowymi i prawdopodobnie wskazuje na mechanizm kompensacyjny w odpowiedzi na oksydacyjne uszkodzenia. Pre-inkubacja komórek z S1P (1 μ M) obniża poziom ekspresji Bcl-2. Stosunek *bax/bcl2*, który uznawany jest za lepsze kryterium prognostyczne potencjału apoptogennego komórki niż ekspresja poszczególnych białek, ulega obniżeniu w komórkach pre-inkubowanych z S1P (*bax/bcl2* = 0,35) w stosunku do komórek traktowanych samym MPP+ (*bax/bcl2* = 0,58) (**Rycina 17C.**).

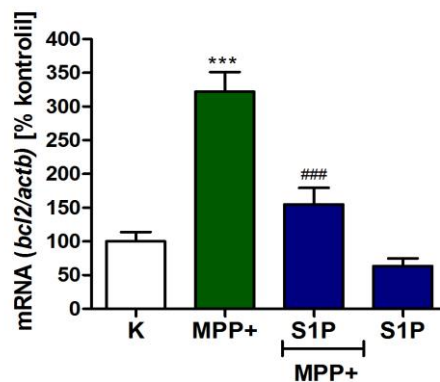
A



B



C

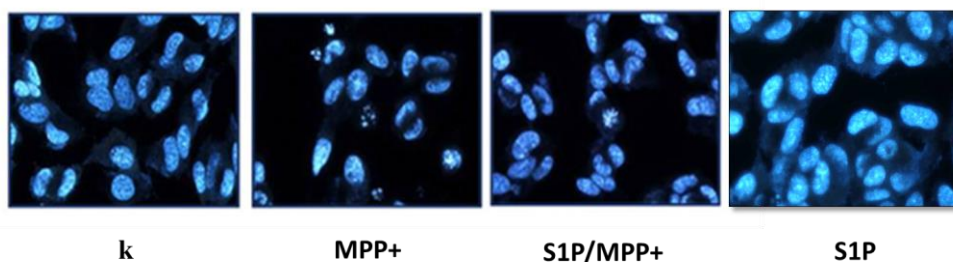


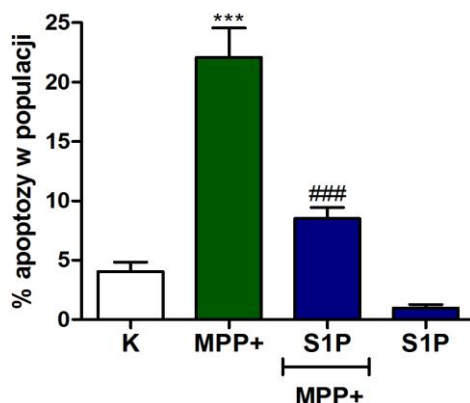
Rycina 17. Wpływ S1P na ekspresję genów białek z rodziny Bcl-2: pro-apoptotycznych (*bax* i *hrk*) oraz anty-apoptotycznych (*bcl2*) w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem MPP+.

Komórki SH-SY5Y poddane były 1 godzinnej pre-inkubacji z S1P (1 μ M), a następnie traktowane MPP+ (3 mM) przez 12 godz. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wynik normalizowany względem β -aktyny (*actb*) stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach), $\#p < 0,05$ $###p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MPP+.

3.3) Identyfikacja apoptozy w obecności S1P w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem MPP+

Kontynuacją badania żywotności komórek SH-SY5Y była wizualizacja jąder komórkowych z użyciem barwnika Hoechst 33342 oraz ich analiza pod kątem cech apoptotycznych w mikroskopie fluorescencyjnym (**Rycina 18**). Zmiany morfologiczne charakterystyczne dla procesu apoptozy, takie jak kondensacja i fragmentacja chromatyny, czy tworzenie ciałek apoptotycznych, występowały licznie w obrazie komórek SH-SY5Y traktowanych MPP+(3 mM). W warunkach pre-inkubacji z S1P (1 μ M) cechy znamienne dla procesu apoptozy były znacznie rzadziej obserwowane. Ponadto zagęszczenie komórek w polu widzenia było wyższe w przypadku układu badawczego traktowanego S1P i MPP+ w stosunku do układu MPP+. Wyliczono procent apoptozy dla każdego z układów badawczych. Analiza wykazała, że egzogeny S1P (1 μ M) zmniejsza o ponad połowę liczbę komórek apoptotycznych w warunkach inkubacji z MPP+ (**Rycina 18.**).





Rycina 18. Wpływ S1P na proces apoptozy w warunkach 24-godzinnej inkubacji z MPP+.

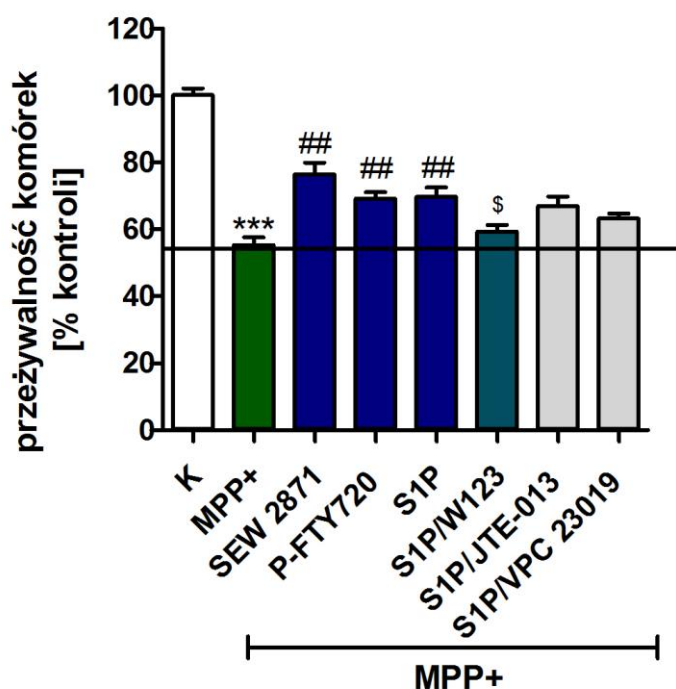
Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z S1P (1 μ M), a następnie traktowane MPP+ (3 mM). Po 24 godz. ekspozycji komórek SH-SY5Y wykonano barwienie sondą fluorescencyjną Hoechst 33342. Wyliczenia procentu apoptozy dokonano na podstawie zdjęć z trzech niezależnych doświadczeń, gdzie dla każdego układu badawczego wykonano cztery powtórzenia, które obserwowanego w pięciu polach widzenia. Procent apoptozy w populacji oznacza procent liczby komórek o cechach apoptotycznych w całej populacji danego układu badawczego. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach), ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MPP+.

4) Weryfikacja receptorowego działania egzogenego S1P

4.1) Analiza wpływu agonistów, w tym fingolimodu (FTY720) i antagonistów receptorów dla S1P na żywotność komórek SH-SY5Y traktowanych MPP+

Jak wyjaśniono we wstępie, S1P działać może zarówno jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik drugiego rzędu, jak i jako pierwszorzędowy przekaźnik za pośrednictwem pięciu błonowych receptorów sprzężonych z białkami G. W badanym modelu neurotoksycznego działania toksyny MPP+ zastosowano egzogeny S1P, który wywierał efekt pro-życiowy, co sugeruje receptorowy mechanizm działania. W celu jego zweryfikowania zastosowano specyficznych agonistów trzech receptorów: S1PR1, S1PR2 oraz S1PR3, wykazujących najwyższą ekspresję w komórkach nerwowych. Analiza żywotności komórek wykazała, że jedynie pre-inkubacja komórek z agonistą receptora pierwszego: SEW2871 (10 μ M) zwiększa żywotność komórek traktowanych MPP+, wskazując na udział szlaków przekaźnictwa zależnych od tego receptora. W celu

potwierdzenia tej hipotezy zastosowano antagonistów receptorów S1P: S1PR1 - W123, S1PR2 – JTE-013 oraz S1PR3 i S1PR1 – VPC23019. Wykazano, że jedynie W123 (20 μM) znosił protekcyjne działanie S1P w warunkach stresu wywołanego MPP+. Analiza żywotności komórek wykazała również, że w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP+ neuroprotekcyjny efekt wywiera ufosforylowany fingolimod (FTY720-P), który jest analogiem S1P i agonistą czterech receptorów S1P (S1PR1, S1PR3, S1PR4 i S1PR5). FTY720-P został zastosowany w bardzo niskim stężeniu (100 pM), które jest 10 tys. razy niższe niż stosowane stężenie S1P (1 μM) (**Rycina 19.**).

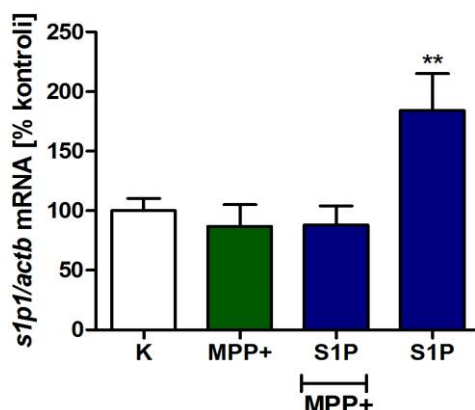


Rycina 19. Działanie S1P oraz agonistów i antagonistów receptorów dla S1P na żywotność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu wywołanego działaniem MPP+ przez 24 godz.

W doświadczeniach zastosowano: S1P (1 μM), SEW2871 (10 μM) - agonistę S1PR1, FTY720-P (100 pM) - agonistę S1PR1, S1PR3, S1PR4 i S1PR5, W123 (20 μM) - antagonistę S1PR1, JTE-013 (1 μM) – antagonistę S1PR2 oraz VPC23019 (1 μM) - antagonistę S1PR1 i S1PR3. Dane związki dodawano na 1 godz. przed podaniem MPP+ (3 mM). Żywotność metodą testu MTT mierzono po 24-godzinnej inkubacji z MPP+. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach), ## $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MPP+, \$ $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych S1P i MPP+.

4.2) Poziom ekspresji receptora *S1PR1* w warunkach inkubacji z *MPP+*

Analiza ekspresji *S1PR1* (nazwa genu *s1p1*) wykazała, że w warunkach stresu wywołanego działaniem *MPP+* poziom mRNA receptora pierwszego nie ulega zmianie, natomiast inkubacja komórek z samym *S1P* (1 μ M) zwiększa poziom mRNA *s1p1* powyżej poziomu kontroli (**Rycina 20.**). Wyniki wskazują zatem na istotną rolę receptora *S1PR1* w mechanizmie działania *S1P*.



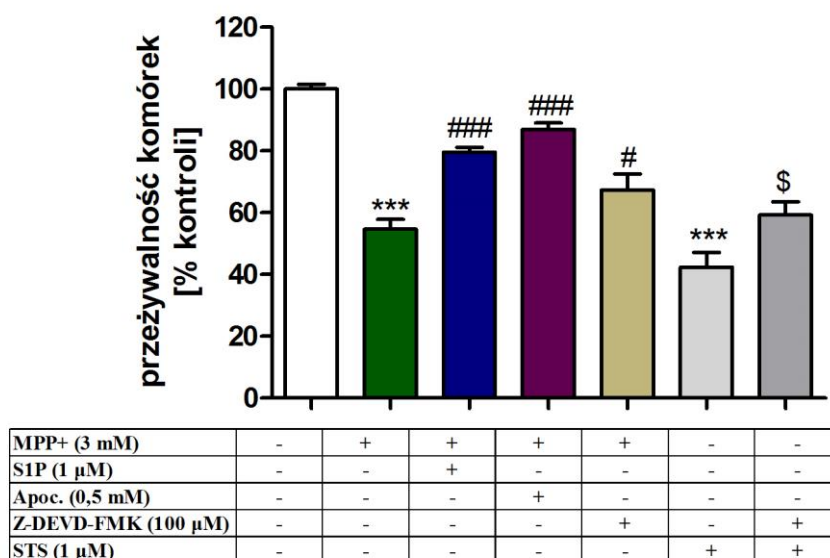
Rycina 20. Wpływ egzogenego *S1P* na poziom ekspresji *s1p1* w warunkach stresu wywołanego *MPP+*.

Komórki *SH-SY5Y* poddane były 1 godzinnej pre-inkubacji z *S1P* (1 μ M), a następnie traktowane *MPP+* (3 mM) przez 3 godz. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny (*actb*). Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, $**p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez *MPP+*, ale w tych samych warunkach).

4.3) Porównanie wpływu *S1P* oraz inhibitora kaspaz na żywotność komórek *SH-SY5Y* traktowanych *MPP+*

Wyniki, które wykazały uwalnianie cytochromu c z mitochondriów (**Rycina 13B.**) oraz wzrost poziomu immunoreaktywności ciętego fragmentu polimerazy PARP-1 (89 kDa) (**Rycina 14.**), jak również obraz komórek traktowanych *MPP+* w mikroskopie fluorescencyjnym (**Rycina 4C.**) wskazywać mogą na apoptotyczną śmierć komórek zależną od kaspaz. Zbadano zatem czy zastosowanie inhibitora wykonawczej kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK, 100 μ M) zahamuje obniżenie żywotności komórek *SH-SY5Y* traktowanych *MPP+*. Jako pozytywną kontrolę zastosowano staurosporynę (STS, 1 μ M),

która aktywuje kaspazę-3 i prowadzi do cięcia PARP-1. Stwierdzono, że inhibitor kaspazy-3 istotnie zwiększa żywotność komórek SH-SY5Y inkubowanych z MPP+, jednak w stopniu niższym niż S1P (1 μ M) oraz jego analog FTY720-P (100pM). Żywotność komórek wzrasta natomiast porównywalnie do S1P po zastosowaniu inhibitora NADPH oksydazy - apocyniny (Apoc., 0,5 mM), co sugerować może istotną rolę stresu oksydacyjnego w śmierci indukowanej MPP+ (**Rycina 21.**).



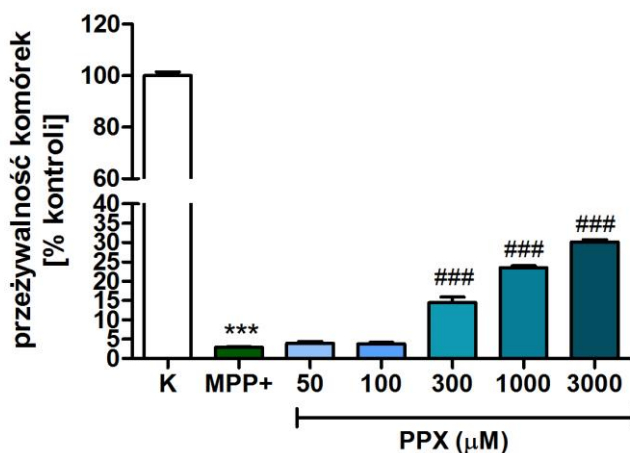
Rycina 21. Wpływ inhibitora kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK) i inhibitora NADPH oksydazy - apocyniny na żywotność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu wywołanego MPP+.

Komórki SH-SY5Y poddawane były 2-godzinnej pre-inkubacji z inhibitorem kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK, 100 μ M), 1-godzinnej pre-inkubacji z S1P (1 μ M), apocyniną (0,5 mM), a następnie traktowane MPP+ (3 mM) lub STS (1 μ M). Żywotność metodą testu MTT mierzono po 24-godzinnej inkubacji z MPP+ lub STS. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z pięciu niezależnych doświadczeń w czterech-sześciu powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach), # $p < 0,05$ ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MPP+, \$ $p < 0,05$. różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych STS.

5) Żywotność komórek SH-SY5Y poddanych pre-inkubacji z pramipeksolem (PPX) w warunkach stresu wywołanego MPP+

W oparciu o powyższą analizę żywotności do kolejnego etapu badań *in vivo* wybrano FTY720-P. Związek podano w formie pozbawionej reszty fosforanowej

(FTY720), zdolnej przenikać barierę krew-mózg. Jego wpływ na wybrane szlaki metaboliczne oraz aktywność motoryczną zwierząt porównano ze znanym lekiem powszechnie stosowanym w terapii ChP: pramipeksolem (PPX). PPX jest agonistą receptorów dopaminergicznych D2/D3. Został on wybrany ze względu na właściwości neuroprotektoryjne, wywierane zarówno na drodze zależnej, jak i niezależnej od receptorów dopaminergicznych. Badania *in vivo* poprzedzono analizą żywotności, która potwierdziła protekcyjny efekt PPX, zależny od stężenia związku (**Rycina 22.**). Procedura traktowania komórek PPX przebiegała zgodnie z opisaną w publikacjach (Kitamura i wsp. 1998; Presgraves i wsp. 2004; Joyce i wsp. 2003). Komórki SH-SY5Y poddano 72-godzinnej pre-inkubacji z PPX, a następnie medium zmieniono na medium z MPP+ (1 mM). Wynik odczytywano po 72 godzinach od dodania MPP+.



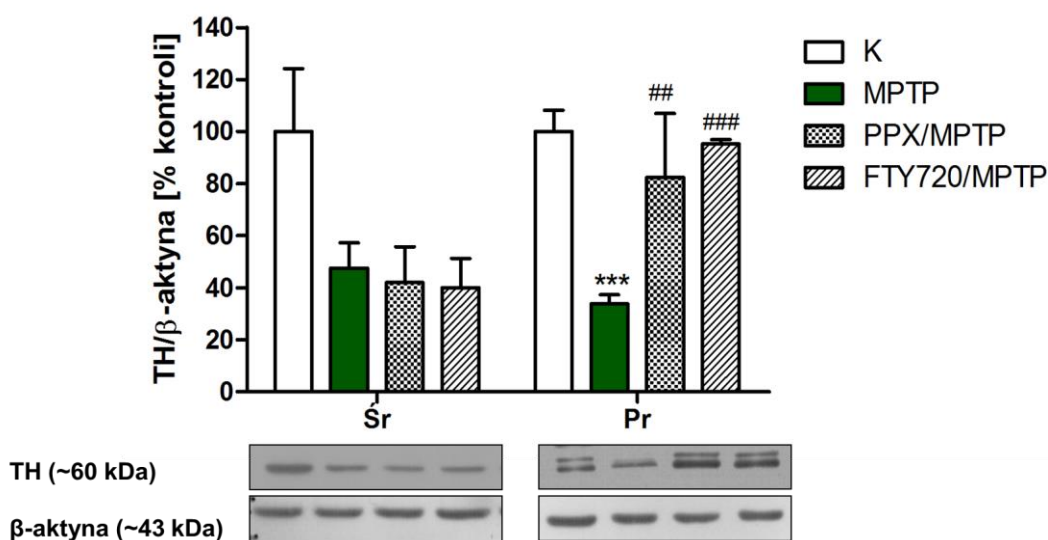
Rycina 22. Wpływ PPX na żywotność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu wywołanego MPP+.

Komórki SH-SY5Y poddawane były 72-godzinnej pre-inkubacji z (50-3000) μM PPX. Następnie po 72 godz. komórki przepłukano medium i poddano inkubacji z MPP+ (1mM). Wynik odczytano po 72 godz. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w sześciu powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych (inkubowanych bez MPP+, ale w tych samych warunkach), ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych MPP+.

Badania in vivo

1) Wpływ FTY720 na poziom immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH-IR) w prążkowie i śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Porównanie z PPX

Stopień uszkodzenia śródmózgowia (Śr) oraz prążkowie (Pr) myszy w modelu ChP, a także właściwości neuroprotektoryjne FTY720 analizowano poprzez zbadanie poziomu immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (ang. tyrosine hydroxylase immunoreactivity, TH-IR) w prążkowie oraz śródmózgowiu myszy poddanych działaniu neurotoksyny MPTP. Poziom TH-immunopozytywnych ciał neuronów w śródmózgowiu oraz zakończeń aksonalnych w prążkowie zwierząt poddanych działaniu MPTP jest uznany w literaturze markerem stopnia uszkodzenia powyższych struktur. Wykazano, że TH-IR w prążkowie po podaniu MPTP ulega obniżeniu do około 35% wartości kontrolnej, co wskazuje na znaczne uszkodzenie neuronów prążkowie. Jednocześnie wykazano, że FTY720 w stopniu znamionym zwiększa TH-IR w prążkowie myszy do 90% wartości kontrolnej, co wskazywać może na właściwości neuroprotektoryjne tego związku. Dla porównania poziom TH-IR po podaniu PPX stanowi około 80 % wartości kontrolnej (**Rycina 23**). W śródmózgowiu myszy z grupy MPTP odnotowano także obniżenie wartości TH-IR jednak nie było ono znamienne statystycznie.

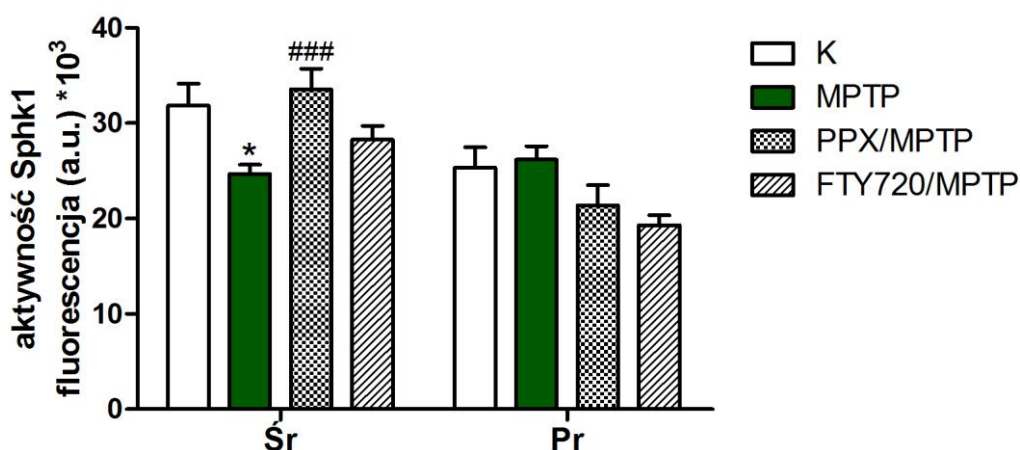


Rycina 23. Wpływ FTY720 i PPX na TH-IR w śródmózgowiu i prążkowie myszy poddanych działaniu MPTP.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg), 6 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), po 6 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) oraz MPTP została zdekapitowana po 15 dniach. Wykresy przedstawiają wynik analizy densytometrycznej TH normalizowanej względem β -aktyny wykonanej w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy kontrolnych, ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy, którym podano MPTP. Nie stwierdzono istotnej różnicy immunoreaktywności między grupą kontrolą (0,9 % NaCl) a kontrolą lekową (PPX lub FTY720). Poniżej wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

2) Aktywność/ekspresja Sphk1 w prążkowie i śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Wpływ FTY720 i PPX

W kolejnym etapie badań w zwierzęcym modelu ChP zweryfikowano kluczowe wyniki uzyskane *in vitro*, wskazujące na obniżoną ekspresję/aktywność kinaz sfingozyny 1 (Sphk1) w stresie oksydacyjnym wywołanym działaniem MPP+. W pierwszej kolejności metodą spektrofluorymetryczną oznaczono aktywność izoformy Sphk1 w prążkowie i śródmózgowiu. Wykazano obniżoną aktywność Sphk1 w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu neurotoksyny MPTP w porównaniu do myszy kontrolnych, co stanowi potwierdzenie wyników uzyskanych w modelu komórkowym. Hamujący wpływ MPTP na aktywność Sphk1 znosiło podanie PPX. Nie stwierdzono zmian w aktywności Sphk1 w prążkowie myszy poddanych działaniu MPTP (**Rycina 24.**).



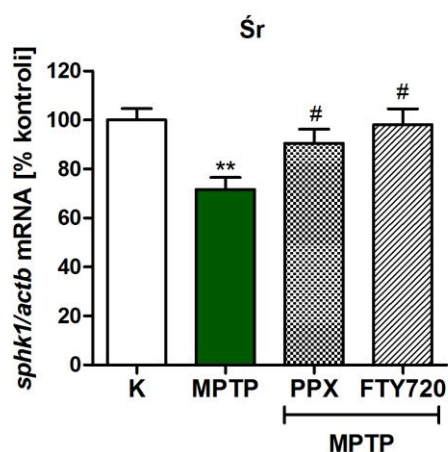
Rycina 24. Wpływ FTY720 i PPX na poziom aktywności Sphk1 w śródmózgowiu i prążkowie myszy poddanych działaniu MPTP.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg), 6 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), po 6 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) oraz MPTP została zdekapitowana po 15 dniach. Wykresy przedstawiają pomiar

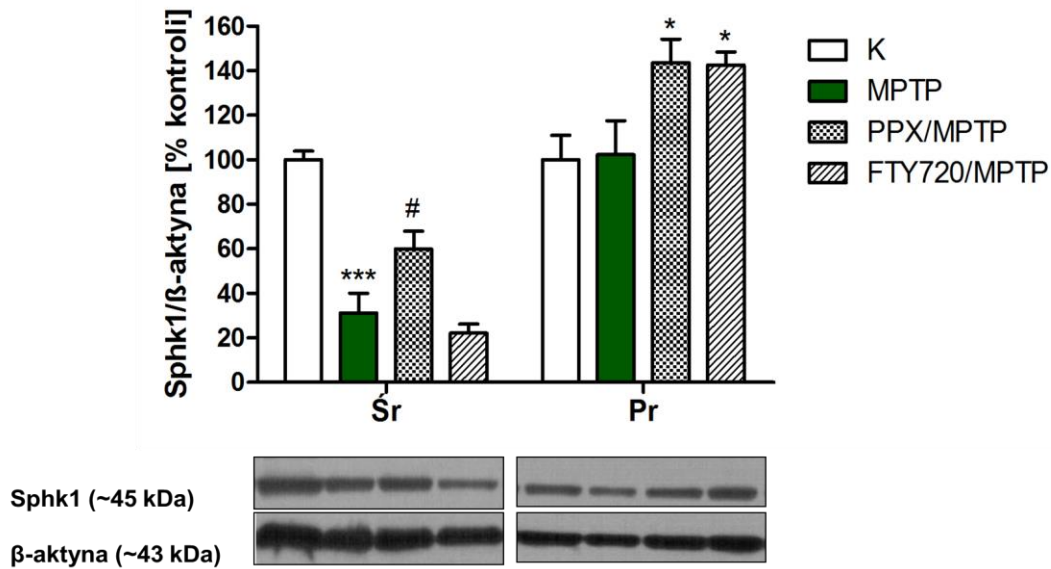
aktywności *Sphk1* wykonany metodą pomiaru fluorescencji NBD-S1P w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy, którym podano MPTP. Nie stwierdzono istotnej różnicy aktywności *Sphk1* między grupą kontrolą (0,9 % NaCl) a kontrolą lekową (PPX lub FTY720).

W dalszym etapie analiza ekspresji genu/poziomu immunoreaktywności *Sphk1* wykazała obniżenie poziomu mRNA i immunoreaktywności *Sphk1* w śródmózgowiu myszy, którym podano MPTP (**Rycina 25 A,B.**). Podanie FTY720 i PPX nie znosiło całkowicie działania MPTP, ale znamienne zwiększało poziom mRNA *sphk1*. Również poziom immunoreaktywności białka wzrastał dwukrotnie po podaniu PPX, w stosunku do MPTP. Podanie FTY720 nie znosiło hamującego działania MPTP na poziom immunoreaktywności *Sphk1*. W prążkowiu myszy poddanych działaniu MPTP poziom białka *Sphk1* nie ulegał zmianie. Odnotowano jednak wzrost immunoreaktywności *Sphk1* po podaniu PPX i FTY720 łącznie z MPTP w stosunku do myszy kontrolnych.

A



B



Rycina 25. Wpływ FTY720 i PPX na poziom mRNA sphk1 i immunoreaktywności Sphk1 w śródmózgowiu i prążkowiu myszy poddanych działaniu MPTP.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg), 6 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), po 6 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) oraz MPTP została zdekapitowana po 15 dniach. Wykresy przedstawiają pomiar poziomu mRNA sphk1 (A) oraz wynik analizy densytometrycznej Sphk1 (B) normalizowane względem β-aktyny, wykonane w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), # $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy, którym podano MPTP. Nie stwierdzono istotnej różnicy immunoreaktywności między grupą kontrolą (0,9 % NaCl) a kontrolą lekową (PPX lub FTY720). Poniżej wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

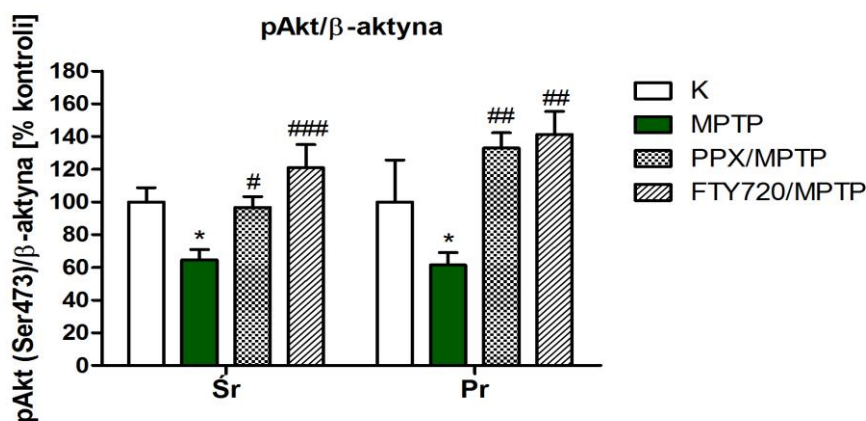
Obniżoną aktywność i ekspresję Sphk1, a tym samym obniżoną syntezę S1P zaobserwowano zarówno w komórkowym, jak i zwierzęcym modelu ChP, co wskazuje na istotną rolę Sphk1/S1P w mechanizmie śmierci komórek nerwowych w przebiegu ChP.

3) Badanie poziomu fosforylacji/aktywności kinazy Akt i wybranych zmian molekularnych w prążkowiu i śródmózgowiu myszy poddanych działaniu FTY720 w modelu ChP. Porównanie z efektem PPX

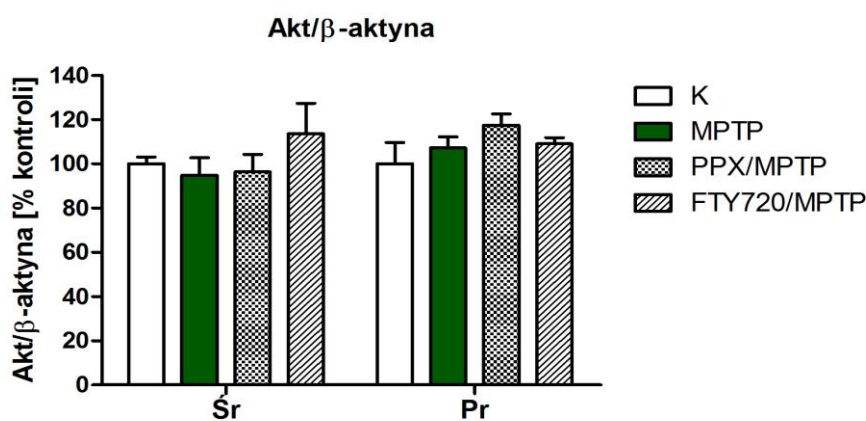
Jak zaznaczono we wstępie, kinaza Akt odpowiedzialna za fosforylację wielu białek związanych z regulacją m.in. transkrypcji i proliferacji komórek jest bardzo

ważnym pro-życiowym białkiem efektorowym szlaku zależnego od pobudzenia receptorów dla S1P. Zbadano poziom fosforylacji na serynie 473 (Ser 473), a tym samym aktywności kinazy Akt w prążkowiu i śródmózgowiu myszy w powyższych układach badawczych. Stwierdzono, że podanie MPTP powoduje obniżenie poziomu fosforylacji kinazy Akt na Ser 473 (pAkt Ser 473). Poziom immunoreaktywności całkowitej kinazy Akt nie ulega zmianie po podaniu MPTP. Stosunek formy ufosforylowanej do całkowitej (pAkt/Akt) ulega znamiennej obniżeniu w prążkowiu i śródmózgowiu w mysim modelu ChP. Podanie myszom zarówno FTY720, jak i PPX zwiększa poziom fosforylacji kinazy Akt na Ser 473 w prążkowiu i śródmózgowiu myszy poddanych dootrzewnowej iniekcji MPTP. Po podaniu PPX i FTY720 stosunek pAkt / β -aktyna znamiennej wzrasta w porównaniu do MPTP, podobnie jak stosunek pAkt /Akt, przy jednoczesnym zachowaniu poziomu kontrolnego całkowitej kinazy Akt we wszystkich układach badawczych. Zmiany te świadczyć mogą o aktywacji kinazy Akt przez badane związki farmakologiczne (**Rycina 26.**).

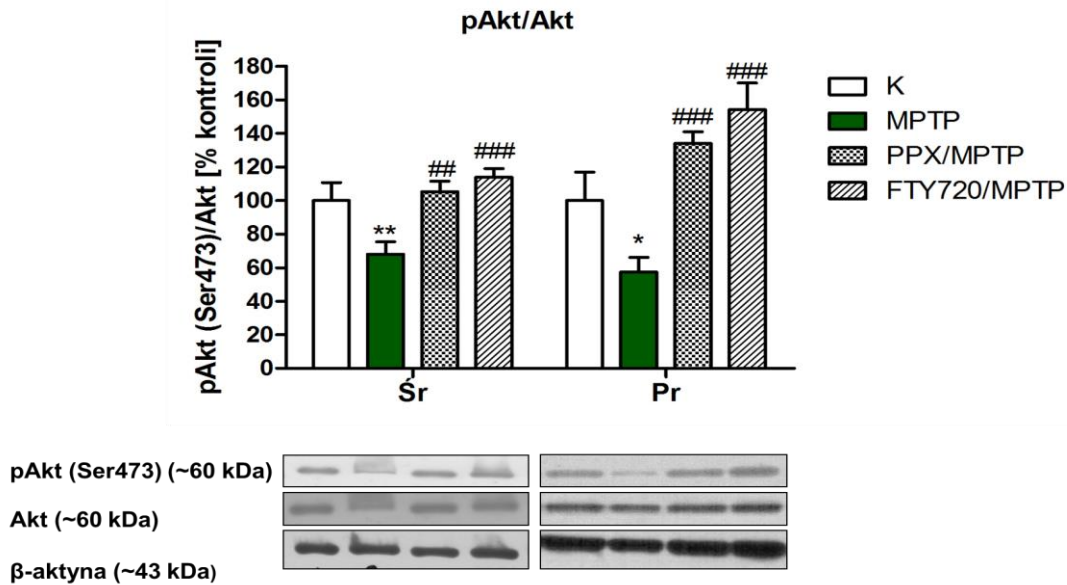
A



B



C

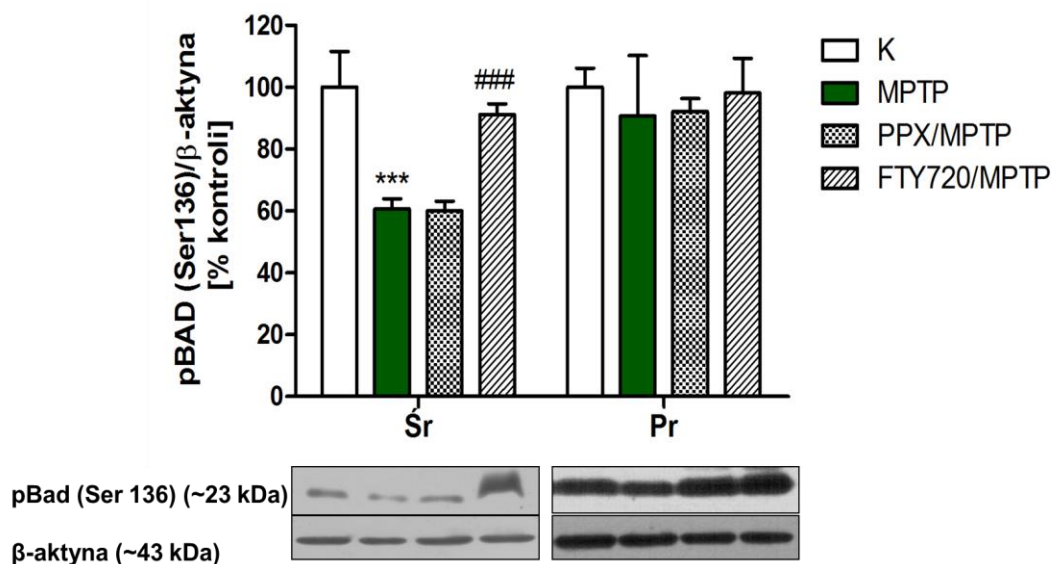


Rycina 26. Wpływ FTY720 i PPX na poziom immunoreaktywności ufosforylowanej i całkowitej kinazy Akt w śródmózgowiu i prążkowie myszy poddanych działaniu MPTP.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg), 6 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), po 6 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) oraz MPTP została zdekapitowana po 15 dniach. Immunoreaktywność kinazy Akt badano metodą Western blot w prążkowie oraz śródmózgowiu myszy. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej, przedstawiony jako iloraz pAkt (Ser 473) do β-aktyny (A), Akt do β-aktyny (B) oraz pAkt (Ser 473)/ Akt (C), który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń ± SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy kontrolnych, # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy, którym podano MPTP. Nie stwierdzono istotnej różnicy immunoreaktywności między grupą kontrolą (0,9 % NaCl) a kontrolą lekową (PPX lub FTY720). Poniżej wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

Jednym z białek efektorowych fosforylowanych przez kinazę Akt jest proapoptyczne białko Bad z rodziny Bcl-2. Białko Bad łącząc się z białkiem antyapoptycznym - Bcl-xL, hamuje zdolności Bcl-xL do blokowania uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy. Fosforylacja Bad na Ser 136 przez kinazę Akt powoduje jego związanie się z białkiem adaptorowym 14-3-3, sekwestrację w cytoplazmie, a w konsekwencji zahamowanie pro-apoptycznego działania. Myszy poddane dootrzewnowej iniekcji MPTP wykazują obniżenie poziomu fosforylacji Bad na Ser 136 w śródmózgowiu w porównaniu do zwierząt kontrolnych, co wskazuje na udział Bad w molekularnym mechanizmie śmierci neuronów śródmózgowia. Po podaniu

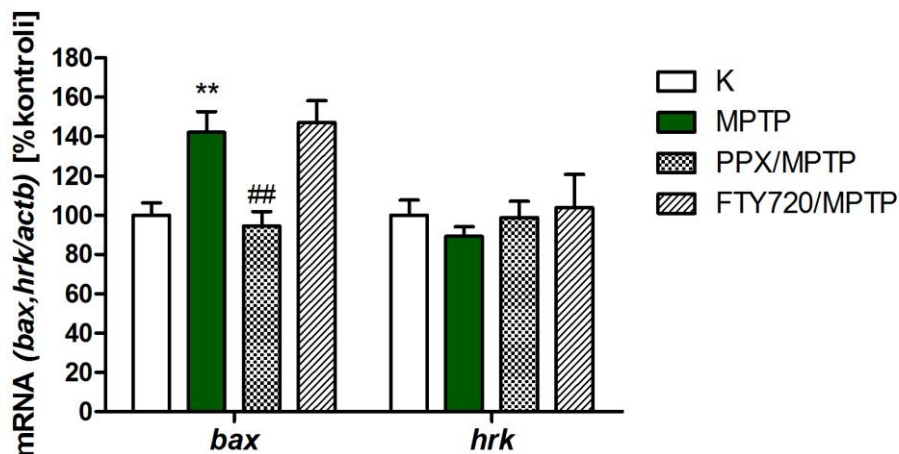
FTY720 zaobserwowano znamiennej wzrost fosforylacji białka Bad w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP, a tym samym spadek jego pro-apoptotycznych właściwości (**Rycina 27.**).



Rycina 27. Wpływ FTY720 i PPX na poziom immunoreaktywności ufosforylowanego białka BAD w śródmózgowiu i prążkowiu myszy poddanych działaniu MPTP.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg), 6 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), po 6 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) oraz MPTP została zdekapitowana po 15 dniach. Immunoreaktywność białka BAD badano metodą Western blot w prążkowiu oraz śródmózgowiu myszy. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej, przedstawiony jako iloraz pBAD (Ser136) do β-aktyny, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń ± SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy kontrolnych, ### $p < 0,001$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy, którym podano MPTP. Nie stwierdzono istotnej różnicy immunoreaktywności między grupą kontrolą (0,9 % NaCl) a kontrolą lekową (PPX lub FTY720). Poniżej wykresu zamieszczono reprezentacyjny wynik Western blot.

Akt może regulować także transkrypcję wielu białek. Zbadano poziom ekspresji pro-apoptotycznych białek Bax i Hrk w śródmózgowiu myszy z farmakologicznie wywołaną ChP. Analiza ekspresji wykazała znaczny wzrost mRNA *bax* w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Kolejno wykazano, że PPX, lecz nie FTY720, znacząco obniża poziom mRNA pro-apoptotycznego białka *bax* w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Poziom ekspresji białka Hrk nie ulegał zmianie w śródmózgowiu myszy we wszystkich układach badawczych (**Rycina 28.**).



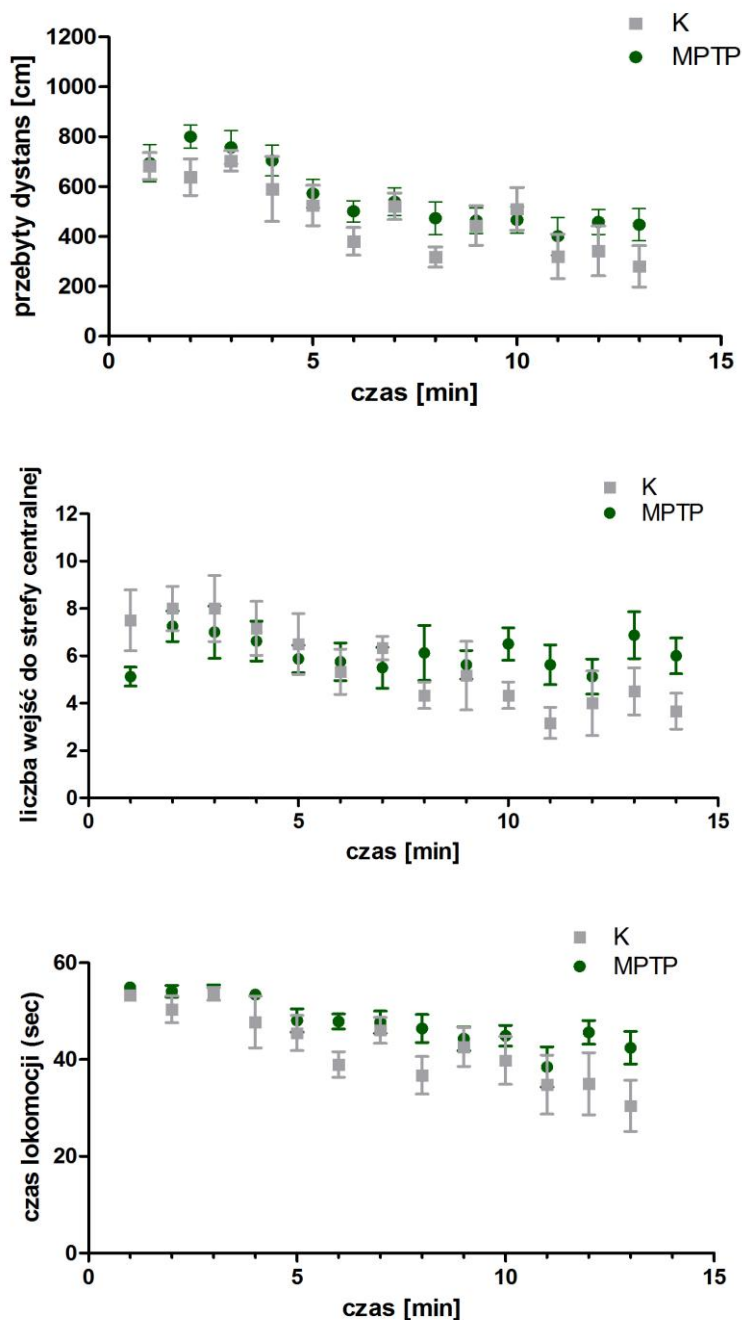
Rycina 28. Wpływ FTY720 i PPX na poziom mRNA białek bax i hrk w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg), 6 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), po 6 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) oraz MPTP została zdekapitowana po 15 dniach. Wykresy przedstawiają pomiar poziomu mRNA bax i hrk normalizowanych względem β -aktyny, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, ** $p < 0,01$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy kontrolnych, ## $p < 0,01$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy, którym podano MPTP. Nie stwierdzono istotnej różnicy ekspresji między grupą kontrolną (0,9 % NaCl) a kontrolą lekową (PPX lub FTY720).

4) Wpływ PPX i FTY720 na aktywność ruchową myszy po podaniu MPTP

4.1) Aktywność ruchowa myszy mierzona w teście otwartego pola

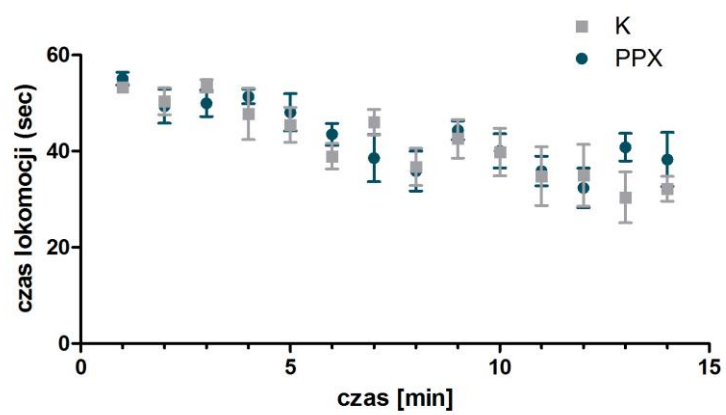
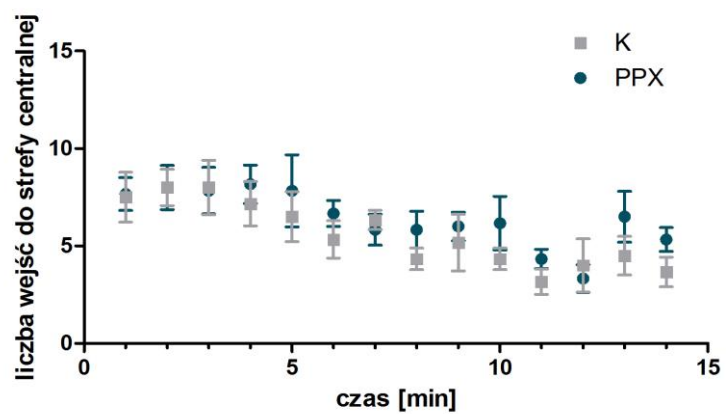
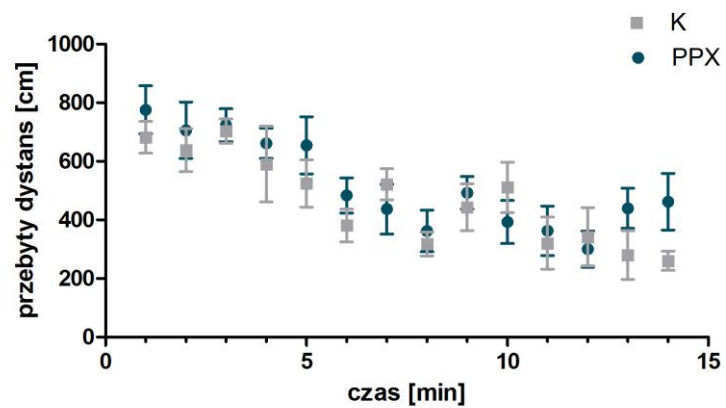
Do oceny aktywności motorycznej myszy zastosowano test otwartego pola oraz test Rotarod. Test otwartego pola został wykonany w 11 dniu eksperymentu. W trzech kolejnych dniach (12, 13 i 14 dniu eksperymentu) wykonano test Rotarod. W teście otwartego pola badano aktywność lokomotoryczną oraz poziom eksploracji i lęku w warunkach swobodnej lokomocji. W analizowanych parametrach otwartego pola, jakimi były całkowity przebyty dystans, liczba wejść do strefy centralnej i całkowity czas lokomocji, nie wykazano istotnych statystycznie różnic między kontrolną grupą (0,9 % NaCl) a grupą MPTP. Poniżej przedstawiono kinetykę zmian dla trzech wymienionych parametrów (**Rycina 29.**).

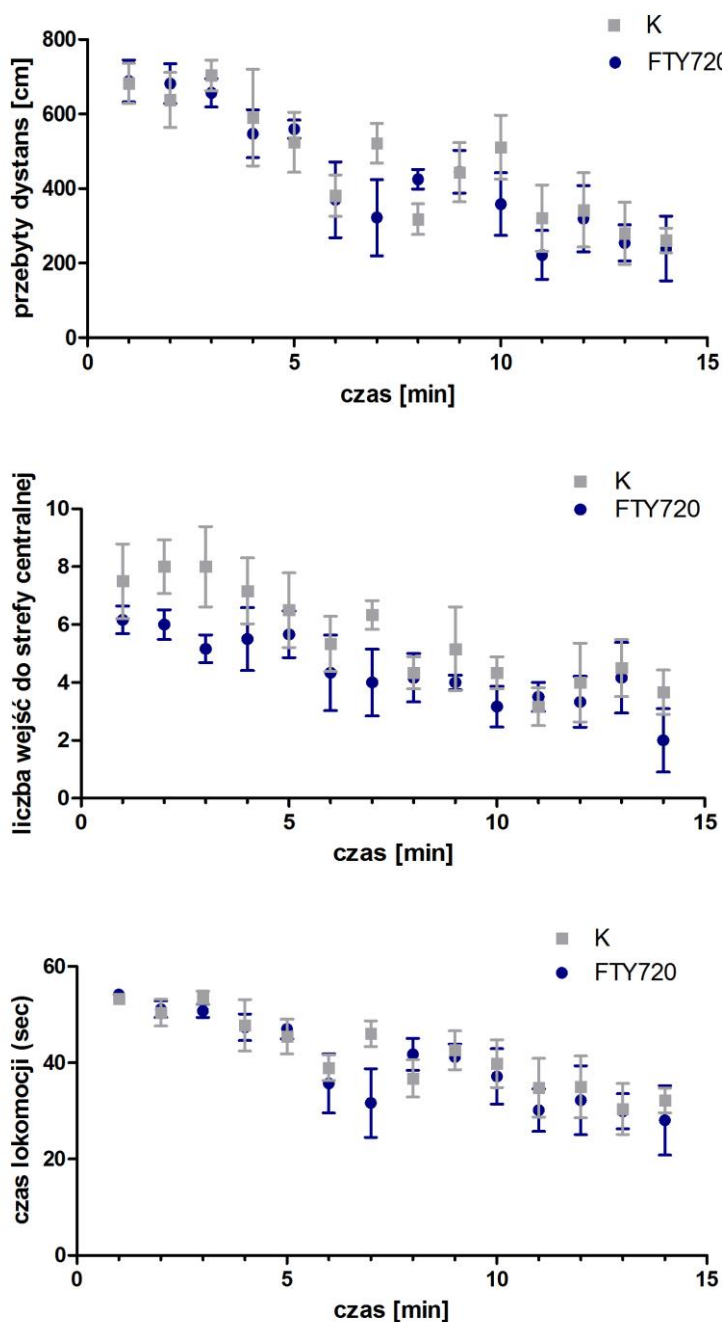


Rycina 29. Analiza zmian aktywności motorycznej myszy poddanych działaniu MPTP w teście otwartego pola.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg) i 8 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl) została poddana testowi otwartego pola w 11 dniu eksperymentu. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test *t*-Studenta. Wykresy przedstawiają kinetykę zmian trzech parametrów (przebyty dystans, liczba wejść do strefy centralnej i czas lokomocji) w czasie piętnastu minut.

Porównując grupę kontrolną i kontrolę lekową (myszy którym podano sam PPX lub FTY720 bez MPTP) nie wykazano istotnych statystycznie różnic w żadnym z mierzonych parametrów (**Rycina 30.**).



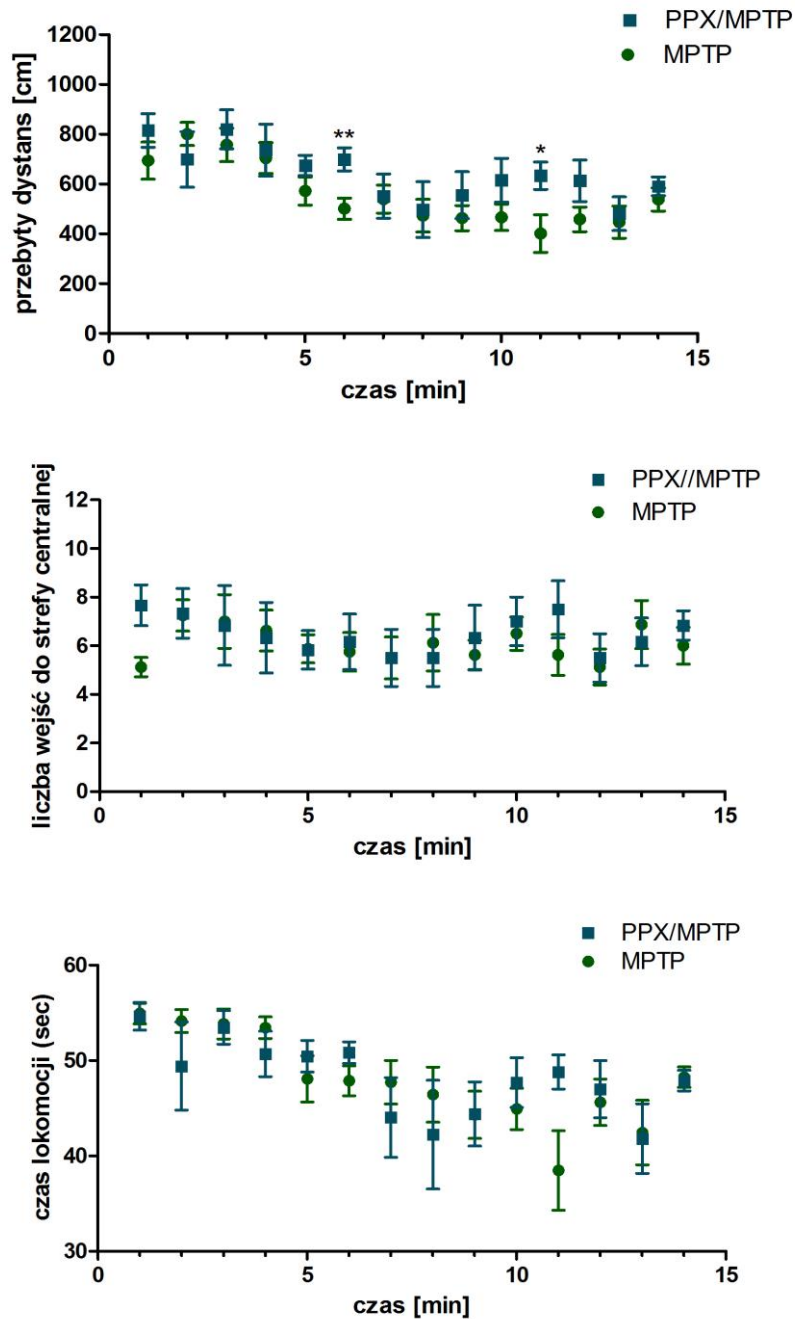


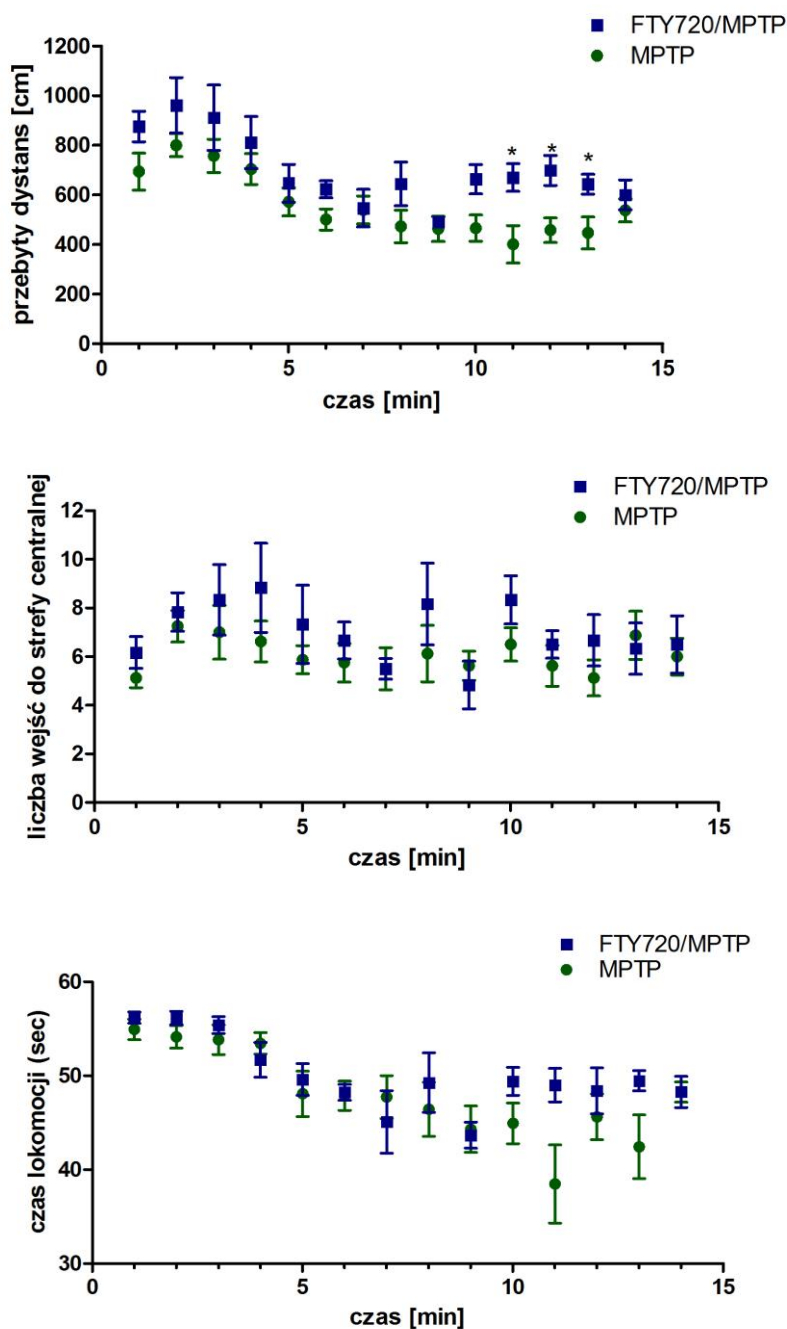
Rycina 30. Analiza zmian aktywności motorycznej myszy poddanych działaniu PPX i FTY720 w teście otwartego pola.

Grupa 8 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), 8 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) została poddana testowi otwartego pola w 11 dniu eksperymentu. Wykresy przedstawiają kinetykę zmian trzech parametrów (przebyty dystans, liczba wejść do strefy centralnej i czas lokomocji) w czasie piętnastu minut.

W kilku punktach czasowych wykazano istotne różnice między grupą MPTP, a zwierzętami które otrzymywały MPTP łącznie z PPX lub FTY720. Przebyty dystans w minucie 6 i 11 oraz 11, 12 i 13 był istotnie dłuższy po podaniu odpowiednio PPX

i FTY720 w stosunku do myszy z grupy MPTP. Zmiana ta nie może jednak zostać uznana za znamiennej z uwagi na brak różnic w tym parametrze między grupą kontrolną a MPTP. W parametrach liczby wejść do strefy centralnej i całkowitym czasie lokomocji nie wykazano istotnych statystycznie różnic między grupą MPTP, a układem poddanym działaniu FTY720 lub PPX oraz MPTP (**Rycina 31.**).



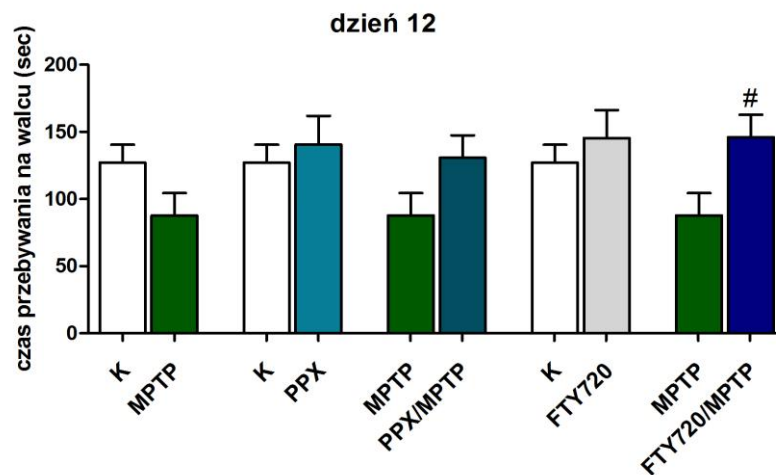


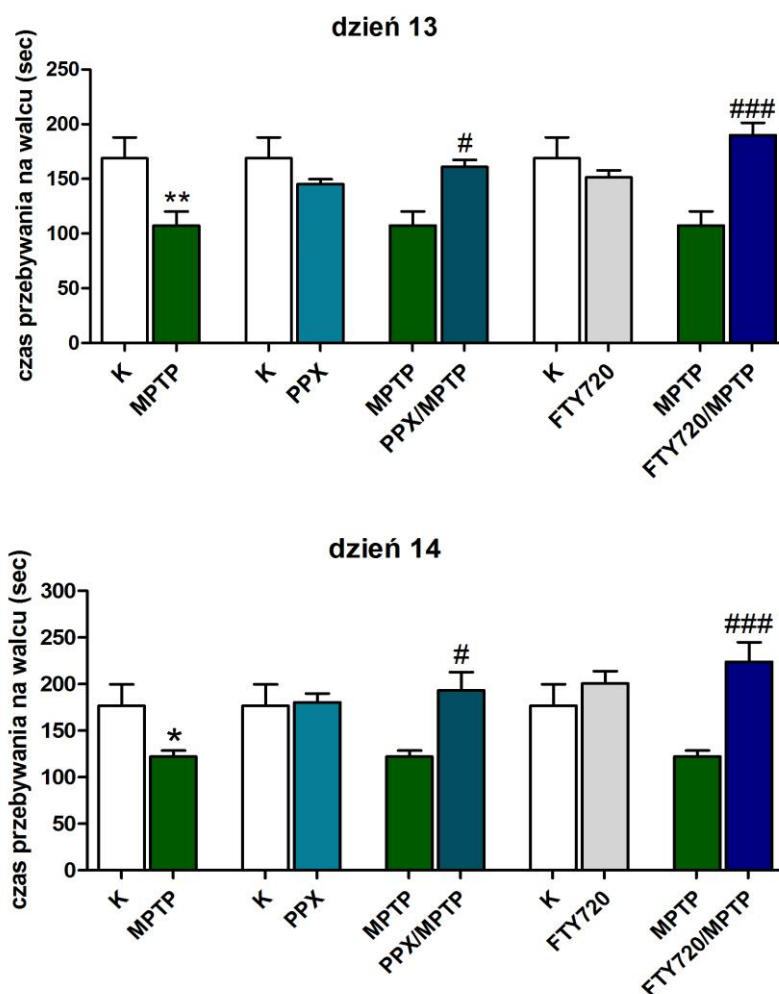
Rycina 31. Wpływ PPX i FTY720 na aktywność motoryczną myszy poddanych działaniu MPTP w teście otwartego pola.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg), 8 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) oraz MPTP została poddana testowi otwartego pola w 12,13 i 14 dniu eksperymentu. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test *t*-Studenta. Wykresy przedstawiają kinetykę zmian trzech parametrów (przebyty dystans, liczba wejść do strefy centralnej i czas lokomocji) w czasie piętnastu minut. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie danej minucie eksperymentu w stosunku do myszy poddanych działaniu MPTP.

4.2) Aktywność ruchowa myszy mierzona w teście Rotarod

W kolejnych trzech dniach eksperymentu (12, 13 i 14 dniu) wykonano test Rotarod, który umożliwia badanie wymuszonej aktywności motorycznej myszy po jej umieszczeniu na poziomo zorientowanym, obrotowym cylindrze zawieszonym nad podłogą klatki. Obroty zaprogramowano tak, aby obracał się on z liniowo wzrastającą prędkością od 1 obrotu na minutę do 40 obrotów na minutę w czasie 300 sekund. Zwierzę starało się utrzymać na obrotowym cylindrze i uniknąć upadku na ziemię. Automatyczne czujniki wyłączały się kiedy zwierzę spadało z cylindra. W doświadczeniu liczył się maksymalny czas przebywania zwierzęcia na precie obrotowym (do momentu upadku). Każda mysz została poddana 3 próbom z 15-minutowym odstępem między próbami. Eksperyment wykazał, że obydwie badane związki farmakologiczne (FTY720 i PPX) w stopniu porównywalnym zwiększały prawie dwukrotnie czas przebywania na walcu obrotowym myszy poddanych działaniu toksyny MPTP. Za istotną różnicę należy uznać jedynie wynik z trzynastego oraz czternastego dnia eksperymentu, kiedy obniżenie aktywności lokomotorycznej myszy z grupy MPTP w porównaniu z grupą kontrolną w teście Rotarod było istotne statystycznie (**Rycina 32.**).





Rycina 32. Wpływ PPX i FTY720 na aktywność motoryczną myszy poddanych działaniu MPTP w teście Rotarod.

Grupa 8 myszy, którym podano MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg), 8 myszy kontrolnych (0,9 % NaCl), po 6 poddanych działaniu PPX (1 mg/kg) lub FTY720 (1 mg/kg) oraz po 8 poddanych działaniu powyższych związków, a następnie MPTP została poddana testowi Rotarod w 12,13 i 14 dniu eksperymentu. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych dla wybranych par Bonferroni, * $p < 0,01$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy kontrolnych, # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ - różnica istotna statystycznie w stosunku do myszy, którym podano MPTP.

Dyskusja

Mimo wieloletnich badań mechanizm śmierci neuronów w przebiegu ChP pozostaje niewyjaśniony, a jej terapia jest niewystarczająco skuteczna. W niniejszej pracy podjęto badania dotyczące znaczenia kinazy sfingozyny (Sphk1), kluczowego enzymu syntezy sfingozyno-1-fosforanu (S1P), w komórkowym i zwierzęcym modelu ChP. W badaniach analizowano udział Sphk1/S1P w regulacji przeżycia/śmierci komórki w modelu ChP wywołanym MPTP/MPP+, który powszechnie stosowany jest jako model analizy zmian molekularnych obserwowanych w ChP. W rozprawie tej po raz pierwszy wykazano obniżoną ekspresję i aktywność Sphk1 oraz stwierdzono jej rolę w mechanizmie śmierci komórki w modelu *in vivo/in vitro* ChP. Ponadto, zbadano znaczenie aktywacji receptorów dla S1P w mechanizmie neuroprotekcijnym w powyższych warunkach, wskazując na nowe możliwości terapeutyczne ChP.

W etiopatogenezie śmierci neuronów w przebiegu ChP uwzględniane są najczęściej: stres oksydacyjny, proces zapalny, ekscytotoksyczność aminokwasów pobudzających oraz teoria szerzenia się nieprawidłowej konformacji białek, głównie białka ASN (Olanow i wsp. 2004; Walsh i Selkoe 2016). Mutacje w genie kodującym ASN i inne białka zaangażowane są w patomechanizm rodzinnej postaci ChP. Zarówno w przypadku sporadycznej, jak i rodzinnej postaci ChP od wielu lat postulowany stres oksydacyjny może prowadzić do dysfunkcji mitochondriów oraz śmierci neuronów (Kieburz i Wunderle 2013; Trinh i Farrer 2013; Ryan i wsp. 2015). Stres oksydacyjny, który jest wyrazem stanu zachwiania równowagi między produkcją i eliminacją WR może powodować uszkodzenia makromolekuł białek, lipidów i DNA oraz zaburzenia w funkcjonowaniu komórki, prowadząc w konsekwencji do jej apoptotycznej lub nekrotycznej śmierci (Sies i Cadenas 1985; Hang i wsp. 2016; Czapski i Strosznajder 2008). W przebiegu ChP na poziomie komórkowym obserwuje się nadmierną produkcję WR, zaburzenia mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów i fosforylacji oksydacyjnej, uszkodzenie mechanizmów anty-oksydacyjnych oraz zmiany w metabolizmie DA i innych katecholamin (Blesa i wsp. 2015).

W niniejszej rozprawie stres oksydacyjny wywoływano toksyną 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) oraz jej aktywnym metabolitem 1-metylo-4-fenylpirydyną (MPP+), które stosowano odpowiednio w badaniach *in vivo* oraz *in vitro*. Toksyna MPTP/MPP+ określana jest mianem „złotego standardu” modelu ChP, gdyż

spośród innych farmakologicznych substancji modelowych jej podanie u zwierząt najlepiej odzwierciedla zmiany patologiczne w mózgu osób chorych oraz symptomy ChP (Blesa i Przedborski 2014; Jackson-Lewis i wsp. 2012). MPTP przenika barierę krew-mózg i w komórkach glejowych metabolizowana jest z udziałem monoaminooksydazy (MAO-B) do aktywnej postaci - MPP⁺, która kolejno selektywnie transportowana jest do neuronów dopaminergicznych z udziałem transportera dla dopaminy (DAT) (Hare i wsp. 2013). MPP⁺ hamuje NADH dehydrogenazę pierwszego kompleksu łańcucha transportu elektronów i upośledza funkcję mitochondriów (Ramsay i wsp. 1989), wywołując stres oksydacyjny i specyficzną oraz powtarzalną degenerację neuronów szlaku czarnoprążkowiowego, a w efekcie objawy parkinsonizmu u myszy, małp a także u ludzi (Burns i wsp. 1983; Hallman i wsp. 1985; Jackson-Lewis i Przedborski 2007; Porras i wsp. 2012). MPTP/MPP⁺ jest związkiem pierwszego wyboru dla badań nad mechanizmem śmierci komórek nerwowych w przebiegu ChP. W pierwszej części niniejszych badań wykazano indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach SH-SY5Y, traktowanych MPP⁺. Toksynę stosowano w stężeniu 3 mM w oparciu o wartość LC₅₀ = 2,97 mM, wyznaczoną w warunkach 24-godzinnej inkubacji komórek SH-SY5Y z MPP⁺. W niniejszych badaniach zastosowano nieróżnicowane komórki SH-SY5Y. Proces różnicowania może wpływać na wrażliwość linii komórkowej SH-SY5Y na toksynę MPP⁺. Badania Presgraves i wsp. (2004) oraz Joyce i wsp. (2003), w których 50% obniżenie żywotności komórek SH-SY5Y różnicowanych kwasem retinowym (RA) zachodziło przy stężeniu odpowiednio 100 μM oraz 1 mM, wskazują na większą wrażliwość komórek różnicowanych na toksyczność MPP⁺. Różnica ta wynikać może z wyższej ekspresji transportera dopaminy DAT w komórkach różnicowanych, który jednocześnie jest preferencyjnym transporterem MPP⁺ (Xie i wsp. 2010). Z drugiej strony badania Khwanraj i wsp. (2015) wykazały, że toksyna MPP⁺ osiąga niższą wartość LC₅₀ (500 μM) w komórkach nieróżnicowanych w porównaniu do komórek różnicowanych RA, gdzie połowa populacji umiera przy stężeniu 1000 μM. Podobnie badania Cheung i wsp. (2009) wykazały, że różnicowanie za pomocą RA wyraźnie zwiększa tolerancję na toksyczność MPP⁺, na co wskazuje obniżoną aktywność kaspazy-3 w komórkach różnicowanych, która w komórkach nieróżnicowanych wzrasta 1,5 raza w warunkach inkubacji z 1 mM MPP⁺. Komórki różnicowane są mniej wrażliwe na toksyczność MPP⁺, co wykazano przez obniżoną aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH), która jest miarą cytotoksyczności związku i wyższy procent

żywołności w teście MTT w stosunku do komórek niezróżnicowanych. W przypadku komórek SH-SY5Y różnicowanych mniejszą wrażliwość na toksyczne działanie MPP⁺ może tłumaczyć aktywacja przez RA pro-życiowego szlaku zależnego od kinazy Akt, co stwarza pewne limitacje, jeżeli chodzi o badanie procesu apoptozy w warunkach toksyczności MPP⁺ (Cheung i wsp. 2009). RA powoduje również wzrost ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-2 i jednocześnie obniżenie ekspresji pro-apoptotycznego białka p53 (Tieu i wsp. 1999). Nieróżnicowane komórki SH-SY5Y traktowane MPP⁺ wykazują natomiast wyraźne cechy apoptotyczne. Na poziomie molekularnym obserwowany jest wzrost ekspresji kaspazy-3, białka p53 oraz stosunku poziomu mRNA białek pro i anty-apoptotycznych z rodziny Bcl-2 (*bax/bcl2*) w warunkach stresu wywołanego 500 μM MPP⁺. Zjawiska te nie są obserwowane w komórkach różnicowanych, traktowanych dwukrotnie wyższą dawką MPP⁺ (Khwanraj i wsp. 2015). W przeprowadzonych przez nas badaniach 24-godzinna inkubacja komórek SH-SY5Y z 3 mM MPP⁺ powodowała zależny od stężenia wzrost poziomu RFT, co wykazała analiza z wykorzystaniem wskaźnika fluorescencyjnego DCF. Zjawisku temu towarzyszyło obniżenie żywotności komórek SH-SY5Y, co pozostaje w zgodzie z badaniami *in vitro/in vivo* z wykorzystaniem toksyny MPTP/MPP⁺ (Gaki i Papavassiliou 2014; Hare i wsp. 2013; Obata i Yamanaka 2001). W zależności od dawki/stężenia toksyny oraz czasu inkubacji, a także rodzaju komórek lub zwierząt dochodzi do wzrostu lub obniżenia ekspresji i aktywności enzymów anty-oksydacyjnych. Do głównych enzymów antyoksydacyjnych należą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, EC 1.15.1.1), katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) i peroksydaza glutationowa (GPx, EC 1.11.1.9). W niniejszych badaniach wykazano hamowanie ekspresji dwóch istotnych enzymów anty-aktydacyjnych: manganowej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2) oraz peroksydazy wodoronadtlenków fosfolipidowych (GPx-4) po 24-godzinnej inkubacji komórek z MPP⁺. SOD2 katalizuje redukcję anionorodnika ponadtlenkowego i jest kluczowym enzymem systemu antyoksydacyjnego w mitochondriach. GPx bierze udział w redukcji nadtlenu wodoru i nadtlenu organicznych z jednoczesnym przekształceniem zredukowanego glutationu (GSH) w jego formę utlenioną. Wzrost poziomu WR oraz aktywację SOD1, SOD2 i GPx stwierdzono w hodowli komórek SH-SY5Y traktowanych MPP⁺ oraz w prądkowiu myszy poddanych działaniu MPTP (Cassarino i wsp. 1997). Andreassen i wsp. (2001) wykazali, że myszy z pojedynczą homozygotyczną delecją *sod2*^{+/-} cechuje większa wrażliwość na toksyczność MPTP,

która wyrażona jest znaczącym ubytkiem neuronów prążkowiec. Ponadto, nadekspresja ludzkiego genu *sod2* u transgenicznyc myszy oraz wzrost całkowitej aktywności enzymu, wywołuje oporność na toksyczne działanie MPTP, czemu towarzyszy trzykrotnie wyższy poziom DA w porównaniu do myszy typu dzikiego (Klivenyi i wsp. 1998). W przypadku dokomorowego podania MPP+ u szczura nie zaobserwowano natomiast istotnej zmiany w aktywności SOD2 (Rubio-Osornio i wsp. 2015). W badaniach *post mortem* pacjentów z ChP wykazano wzrost aktywności SOD1 i SOD2 (Saggu i wsp. 1989; Marttila i wsp. 1988) oraz obniżenie aktywności GPx (Kish i wsp. 1985) w istocie czarnej. Wzrost aktywności tych enzymów wykazano również w surowicy krwi pacjentów z ChP (Kalra i wsp. 1992). Obniżenie poziomu zredukowanego glutationu (GSH), który jest utleniany przez GPx w istocie czarnej jest wcześniej obserwowaną zmianą biochemiczną w ChP, która towarzyszy postępowi choroby (Andersen 2004). Biorąc pod uwagę powyższe dane można wnioskować, że obserwowane w tej pracy obniżenie poziomu mRNA *sod2* i *gpx4* jest wynikiem silnego stresu, który nie może być funkcjonalnie kompensowany przez enzymy antyoksydacyjne i prowadzi do śmierci komórki. Spośród zastosowanych inhibitorów ważnych szlaków sygnalizacyjnych znamienne wzrost żywotności komórek SH-SY5Y poddanych działaniu 3 mM MPP+ powodował jedynie inhibitor NADPH oksydazy (apocynina). Nie stwierdzono protekcyjnego działania inhibitorów cyklooksyzgenaz (indometacyny), lipoksygenaz (zileutonu, baikaleiny), inhibitora megakanalu mitochondrialnego (cyklosporyny A), a także inhibitorów polimerazy poli(ADP-rybozy) na przeżywalność komórek SH-SY5Y w warunkach inkubacji z MPP+ (dane nie prezentowane). Wyniki te sugerować mogą, że w powyższych warunkach stresu oksydacyjnego toksyczność MPP+ w znamiennej stopniu zmniejszają jedynie związki o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, w tym przypadku apocynina.

W zastosowanych warunkach stresu poddano analizie poziom ekspresji i aktywności Sphk1, enzymu kluczowego w syntezie zewnątrzkomórkowej puli S1P. Obniżenie aktywności Sphk1, a tym samym syntezy S1P w komórkowych i zwierzęcych modelach stresu oksydacyjnego stało się żywo dyskutowanym tematem badań ostatnich dwóch dekad (Pchejetski i wsp. 2007; Gomez-Brouchet i wsp. 2007, Pyne i wsp. 2016; Takabe i wsp. 2008). Istnieje także wiele doniesień dotyczących zaburzeń Sphk1 oraz obniżonego poziomu S1P w innych chorobach neurodegeneracyjnych, u podłoża których leży stres oksydacyjny, m.in. w chorobie Alzheimera (ChA) (Ceccom i wsp. 2014;

Couttas i wsp. 2014; Katsel i wsp. 2007; Gomez-Brouchet i wsp. 2007). Udział sfingolipidów w patomechanizmie ChP jest zagadnieniem słabo poznanym. W niniejszej pracy, po raz pierwszy wykazano obniżoną aktywność całkowitą Sphk1 i Sphk2 w homogenacie komórkowym, a także obniżenie aktywności Sphk1 we frakcji cytozolowej i Sphk2 w zgrubnej frakcji jądrowej w komórkach SH-SY5Y, poddanych działaniu MPP+. Obniżeniu ulegała także ekspresja genu dla Sphk1, wyrażona niższym poziomem mRNA oraz immunoreaktywności badanej izoformy kinazy sfingozyny – Sphk1. Równocześnie wykazano podwyższenie ekspresji liazy S1P, która odpowiada za degradację aktywnego sfingolipidu (S1P). Przeprowadzone badania w modelu *in vivo* ChP potwierdziły obserwowane w badaniu *in vitro* obniżenie zarówno ekspresji, jak i aktywności Sphk1 w śródmózgowiu myszy. Zjawiska te świadczą o hamowaniu syntezy S1P oraz aktywacji jego degradacji w modelu MPTP/MPP+. Do chwili obecnej brak jest danych literaturowych dotyczących udziału Sphk1 w mechanizmie stresu oksydacyjnego i śmierci komórek w modelu ChP. Sivasubramanian i wsp. (2015) wykazali obniżenie ekspresji Sphk2 w istocie czarnej myszy poddanych działaniu MPTP. W modelu komórkowym inhibicja Sphk2 obniżała ekspresję genów kluczowych dla funkcji mitochondriów, a także redukowała pulę ATP i zwiększała poziom WR. Badania te dowodzą istotnej roli wewnątrzkomórkowej puli S1P, syntetyzowanej w głównej mierze przez Sphk2, zlokalizowanej w zależności od typu komórek głównie w jądrze komórkowym, ale również w mitochondriach i siateczce śródplazmatycznej (Neubauer i Pitson 2013). W przedstawionych w rozprawie badaniach uwagę skoncentrowano na udziale Sphk1 w procesie przeżycia/śmierci komórki. Izoforma ta w wyniku działania czynników wzrostu przemieszcza się z cytozolu do błony komórkowej i odpowiada za syntezę puli S1P transportowanej do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. S1P może działać w sposób auto i parakryny za pośrednictwem pięciu błonowych receptorów S1PR1-5 sprzężonych z białkami G (Takabe i wsp. 2008; Pyne i wsp. 2016). Sphk1 jest enzymem, którego aktywność zależy w dużej mierze od potencjału redox komórki. W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do inhibicji, a niekiedy także do degradacji Sphk1. Jej obniżona aktywność prowadzi kolejno do wzrostu poziomu WR, co potęguje zmiany oksydacyjne w komórce, prowadząc do jej śmierci (Maceyka i wsp. 2007). Zgodnie z hipotezą biostatu sfingolipidów, wraz z hamowaniem aktywności Sphk1, dochodzi do obniżenia poziomu S1P i aktywacji sygnału pro-życiowego. Zjawisku temu towarzyszy akumulacja pro-apoptotycznego ceramidu, który może aktywować procesy

wolnorodnikowe. Zachwianie równowagi S1P/ceramid w komórce na korzyść ceramidu może prowadzić do jej programowanej śmierci (Cuvillier i wsp. 1996; Czubowicz i Strosznajder 2014). Jak zaznaczono, do chwili obecnej nie ma danych dotyczących poziomu ekspresji/aktywności Sphk1 w analizie *post mortem* mózgow pacjentów z ChP ani w modelach *in vitro/in vivo* tej choroby. W ostatnich kilku latach zagadnienia te były badane zarówno w mózgach autopsyjnych pacjentów z ChA, jak i w komórkowych i zwierzęcych modelach ChA. Analiza *post mortem* wykonana w kilku niezależnych ośrodkach na świecie wykazała obniżoną syntezę oraz wzmożoną degradację S1P w mózgach pacjentów z ChA. Obserwowana zmiana poziomu S1P jest proporcjonalna do stopnia zaburzeń czynności poznawczych, mierzonych w skali Braak'a (Ceccom i wsp. 2014; Couttas i wsp. 2014; He i wsp. 2010). Badania Ceccom i wsp. (2014) pokazały po raz pierwszy obniżenie poziomu ekspresji Sphk1 oraz wzrost ekspresji liazy S1P w rejonie kory śródwęchowej bogatej w złogi amyloidu β (A β). Couttas i wsp. (2014) wykazali obniżoną aktywność obydwu izoform Sphk1 i Sphk2 w hipokampie oraz części skroniowej istoty szarej pacjentów z ChA. W istocie szarej odnotowano także niższy poziom aktywności fosfatazy S1P oraz obniżoną ekspresję liazy S1P. W wyniku tych zaburzeń pacjenci z ChA wykazywali obniżony poziom S1P w rejonie CA1 hipokampa oraz w dolnym zakręcie skroniowym istoty szarej w porównaniu do pacjentów kontrolnych w podobnym wieku. Badania He i wsp. (2010) przedstawiają istotną korelację pomiędzy zredukowanym poziomem S1P a wzrostem stężenia peptydów A β oraz hiperfosforylacją białka Tau w mózgach pacjentów z ChA. Gąssowska i wsp. (2014) dowiedli natomiast, że endogennie uwalniane peptydy A β powodują znaczne hamowanie ekspresji i aktywności zarówno Sphk1, jak i Sphk2 w komórkach PC12 transfekowanych ludzkim genem dla białka prekursorowego A β (ang. amyloid beta precursor protein, APP). Peptydy A β dodawane zewnątrzkomórkowo do hodowli komórkowej SH-SY5Y również powodują hamowanie aktywności Sphk1 oraz obniżenie poziomu S1P. Zjawiska te mogą zależeć od potencjału redox. W badaniach Gomez-Brouchet i wsp. (2007) inkubacja komórek z anty-oksydantem znosi inhibicję Sphk1. Obniżoną ekspresję Sphk1 w warunkach toksyczności peptydów A β w komórkach neuronalnych oraz w komórkach PC12 wykazano także w badaniach Yang i wsp. (2014) oraz Cieślak i wsp. (2015). W warunkach stresu wywołanego A β protekcyjny efekt wykazuje nadekspresja genu *sphk1*. Wyciszenie ekspresji *sphk1* przez interferencyjny RNA (*sphk1*-siRNA) u myszy APP/PS1 potęguje odkładanie złogów A β

oraz pogarsza procesy uczenia się i pamięci zwierząt (Zhang i wsp. 2013). Badania w linii komórkowej kardiomioblastów wykazały obniżenie aktywności Sphk1 i poziomu S1P oraz wzrost poziomu ceramidu w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego nadtlaniem wodoru (Pchejetski i wsp. 2007). Aktywację kinazy Sphk1 obserwowano natomiast w warunkach uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego w wyizolowanych mysich kardiomiocytach oraz w krótkim czasie działania peptydów A β (Cieślik i wsp. 2015; Means i wsp. 2007). Przedłużenie czasu inkubacji z A β lub stabilna transfekcja APP i uwalnianie A β prowadzą do inhibicji Sphk1 (Cieślik i wsp. 2015; Czapski i wsp. 2013). Utrzymanie stałego poziomu aktywności i ekspresji Sphk1 jest więc istotnym czynnikiem homeostazy komórkowej w neuronach.

W niniejszej rozprawie zbadano, jaką rolę w mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y odgrywa farmakologiczne zahamowanie aktywności Sphk1. Zagadnienie znaczenia hamowania aktywności Sphk1 w komórkowym modelu ChP jest bardzo słabo poznane. Inhibicja Sphk1/2 budzi bowiem największe zainteresowanie kliniczne w strategii przeciwnowotworowej. Specyficzny inhibitor Sphk2 - ABC294640, który wywiera przeciwnowotworowe działanie w szeregu badań w modelach komórkowych i zwierzęcych, jest obecnie w fazie II badań klinicznych dotyczących leczenia zaawansowanych guzów litych (Ding i wsp. 2016). Ponadto, nadekspresja Sphk1 jest obserwowana w wielu linach komórek nowotworowych (prostaty, mózgu, piersi, nerek, płuc), co wiązać się może z adaptacją do warunków hipoksji (Ader i wsp. 2008). Wykazano także, że farmakologiczna inhibicja Sphk1 lub wyciszenie jej genu prowadzi do wzrostu poziomu WR i czyni komórki bardziej wrażliwymi na chemioterapię (Huwiler i wsp. 2011). Zdecydowanie mniej badań poświęconych jest znaczeniu inhibicji Sphk1 w chorobach, którym towarzyszy nadmierne obumieranie komórek, w tym w chorobach neurodegeneracyjnych. W niniejszej rozprawie analizowano poziom WR i żywotność komórek SH-SY5Y oraz badano mechanizm ich śmierci w farmakologicznie wywołanym hamowaniu aktywności Sphk1. Zastosowano związek - 2-(p-hydroksyanilino)-4-(p-chlorofenylo)tiazol (SKI II) w stężeniu 5 μ M. Związek ten jest pierwszym nielipidowym inhibitorem Sphk1. SKI II indukuje poliubikwitynację i proteasomalną degradację izoformy pierwszej (Ren i wsp. 2010; Loveridge i wsp. 2010), natomiast nie aktywuje degradacji Sphk2 (Watson i wsp. 2013). Oprócz hamowania procesu nowotworzenia, SKI II stosowany w modelach *in vivo* wykazuje zdolność tłumienia nadmiernej reaktywności oskrzeli (Chiba i wsp. 2010; Nishiuma i wsp. 2008), zmniejsza skuteczność

prekondycjonowania ischemicznego w mózgu (Yung i wsp. 2012) i postępu miażdżycy u myszy (Poti i wsp. 2015). IC_{50} SKI II *in vitro* dla Sphk1 wynosi 35 μ M (Gao i wsp. 2012). W niniejszych eksperymentach zastosowano SKI II w stężeniu 5 μ M, wyznaczonym na podstawie wartości LC_{50} uzyskanej z krzywej żywotności w warunkach 24-godzinnej inkubacji komórek SH-SY5Y z SKI II. Zastosowane stężenie odpowiada średniej wartości LC_{50} dla większości linii komórkowych (French i wsp. 2006; Li i wsp. 2014). SKI II wywołuje apoptozę w wielu liniach nowotworowych oraz hamuje wzrost guza w mysim modelu gruczolaka sutka (French i wsp. 2003, 2006; Cheng i wsp. 2015; Zhang i wsp. 2015). Istnieją jednak nieliczne badania z zastosowaniem SKI II prowadzone na komórkach neuronalnych SH-SY5Y. Gomez-Brouchet i wsp. (2007) wykazali, że inhibicja Sphk1 z zastosowaniem SKI II (5 μ M) znosi cytoprotekcyjny efekt insulinopodobnego czynnika wzrostu w warunkach stresu wywołanego peptydami A β . Inhibitor ten obniża także żywotność komórek PC12 transfekowanych APP (Gąssowska i wsp. 2014). Wyniki doświadczeń prezentowanych w niniejszej pracy wykazały, że inkubacja komórek SH-SY5Y z 5 μ M SKI II powoduje wzrost poziomu WR, zwiększa procent komórek apoptotycznych, a także wpływa hamująco na kinazę Akt, białko istotnego szlaku pro-życiowego w komórce. W niniejszej rozprawie wykazano, że stopień fosforylacji kinazy Akt na Ser 473, a tym samym poziom jej aktywności ulegał obniżeniu w warunkach inhibicji Sphk1. Serynowo-treoninowa kinaza Akt, zwana także kinazą białkową B (PKB) jest głównym efekтором kinazy fosfatydyloinozytolu-3 (PI3K), pośrednicząc w odpowiedzi komórek na działanie czynników wzrostu (Franke i wsp. 1995; Dudek i wsp. 1997). Jednocześnie kinaza Akt jest jednym z kluczowych białek efektorowych w przekazywaniu sygnału zależnego od pobudzenia receptorów S1P, głównie S1PR1 oraz w mniejszym stopniu S1PR3. Obydwa receptory sprzężone z $G_{\alpha i}$ pośredniczą w stymulacji PI3K/Akt i białka Rac, przez co aktywują proliferację i migrację komórek (Sugimoto i wsp. 2003). Liczne badania, również te prowadzone na materiale ludzkich tkanek nowotworowych dowodzą, że przeżycie i proliferacja komórek z nadekspresją *sphk1* zależne są od pobudzenia kinazy Akt (Li i wsp. 2016; Bouquerel i wsp. 2016; Bao i wsp. 2016). Inkubacja różnych linii komórkowych z SKI II powoduje obniżenie poziomu fosforylacji/aktywności Akt (Beckham i wsp. 2013; Yang i wsp. 2012; Zhang i wsp. 2013). W przedstawionej pracy zastosowanie inhibitora SKI II powodowało hamowanie fosforylacji Akt na Ser 473, a tym samym obniżenie jej aktywności w komórkach SH-SY5Y, co pozostaje w słuszności z hipotezą wzajemnej

regulacji obydwu kinaz. Z jednej strony, inhibicja Sphk1 hamuje aktywność Akt. Z drugiej strony, zahamowanie aktywności Akt zmniejsza aktywność Sphk1, prowadząc tym samym do zaburzenia biostatu S1P/ceramid na korzyść pro-apoptotycznego ceramidu i do śmierci komórki (Xu i wsp. 2016). Nadekspresja Sphk1 lub egzogenne podanie S1P i pobudzenie receptorów S1PR1 oraz S1PR3 powoduje wzrost poziomu fosforylacji/aktywności kinazy Akt (Limaye i wsp. 2005; Nakahara i wsp. 2012). Akt odpowiada za fosforylację licznych białek, związanych z regulacją podstawowych procesów komórkowych, takich jak transkrypcja, apoptoza, proliferacja czy migracja komórek. Akt bierze udział w regulacji ekspresji pro-apoptotycznego białka Bax, które może oddziaływać z błoną mitochondrialną, zwiększając jej przepuszczalność. Udowodniono, że Akt może hamować pro-apoptotyczną aktywność Bax bezpośrednio przez fosforylację Bax na Ser 184 (Duronio 2008; Linseman i wsp. 2004). Akt może regulować także transkrypcję Bax przez koaktywator czynników transkrypcyjnych - YAP oraz przez hamowanie zdolności p73 do aktywacji transkrypcji genu Bax i innych genów białek pro-apoptotycznych (Downward i Basu 2008). W niniejszej pracy analiza ekspresji genów białek z rodziny Bcl-2 w warunkach inhibicji Sphk1 wykazała wzrost poziomu mRNA *bax* oraz pro-apoptotycznego białka *hrk* z podrodziny –BH3-only. Wzrost poziomu mRNA *bax* w warunkach inkubacji z SKI II pozostaje w zgodzie z badaniami tego inhibitora w innych liniach komórkowych, w których obserwuje się indukcję apoptozy, wzrost ekspresji Bax oraz ilorazu poziomów mRNA *bax/bcl-2*, który definiuje wrażliwość/oporność komórek na apoptozę (Li i wsp. 2014; Zhu i wsp. 2012). Zaobserwowany wzrost ekspresji Bax pozostaje w słuszności z zaburzeniem biostatu sfingolipidowego, w którym inhibicji Sphk1 towarzyszy wzrost poziomu pro-apoptotycznego ceramidu. Wiadomo, że białko Bax oddziaływać może z polarnym fragmentem ceramidu i uczestniczyć w permeabilizacji zewnętrznej błony mitochondrialnej (Colombini 2016). Kilka badań, w tym również naszego zespołu pokazuje, że aktywacja pro-apoptotycznej kaskady zdarzeń jest zależna od białka Hrk/DP5 (Pyszko i Strosznajder 2014a; Czubowicz i Strosznajder 2014; Young i wsp. 2009). Hrk jest białkiem pro-apoptotycznym Bcl-2 z podrodziny „BH3-only” i odgrywa ważną rolę na etapie rozwoju embrionalnego układu nerwowego. Myszy z podwójną homozygotyczną delecją genu dla *hrk* wykazują zaburzenia procesu programowanej śmierci komórek w okresie rozwoju układu nerwowego (Ghosh i wsp. 2011). Aktywacja ekspresji *hrk* w komórkach układu nerwowego zachodzi natomiast w odpowiedzi na niski

poziom czynnika wzrostu neuronów (NGF) (Ham i wsp. 2005). W modelu, określanym w literaturze jako model derepresji, białko *hrk* należy do tzw. „uczulaczy”, których rolą jest kontrola aktywności białek anty-apoptotycznych: Bcl-2 i Bcl-X_L (Chipuk i wsp. 2010). Nadekspresja genów tych anty-apoptotycznych białek chroni hematopoetyczne komórki progenitorowe przed apoptozą zależną od *hrk* w warunkach braku czynników wzrostu (Sanz i wsp. 2000). Hrk nie oddziałuje bezpośrednio z białkiem pro-apoptotycznym Bax, ale pośrednio umożliwia jego aktywację przez uwolnienie z kompleksu Bax-Bcl-xL, interakcję z błoną mitochondrialną i w konsekwencji aktywację apoptozy. Ekspresja tego pro-apoptotycznego białka regulowana jest głównie na poziomie transkrypcji. W wyniku aktywacji kinazy JNK dochodzi do fosforylacji białka c-jun, które jest składnikiem czynnika transkrypcyjnego AP-1, odpowiedzialnego za regulację ekspresji *hrk* (Chen i wsp. 2006). Badania przedstawione w niniejszej rozprawie po raz pierwszy wykazały znaczny wzrost poziomu mRNA *hrk* w warunkach farmakologicznej inhibicji Sphk1. Zjawisko to częściowo tłumaczyć można zachwianiem równowagi S1P/ceramid na korzyść pro-apoptotycznego ceramidu. Wspomniane wyżej badania Chen i wsp. (2006) wykazały, że w oligodendrocytach w warunkach stresu indukowanego C2-ceramidem następuje aktywacja kinazy JNK i wzrost ekspresji genu dla *hrk*. W badaniach Czubowicz i Strosznajder (2014) wysoki poziom mRNA tego pro-apoptotycznego białka, obserwowany w stresie wywołanym ceramidem ulegał obniżeniu w wyniku pre-inkubacji komórek SH-SY5Y z egzogennym S1P. Niniejsze badania wykazały, że Hrk może być zaangażowane w mechanizm śmierci komórek SH-SY5Y w warunkach zmniejszonej aktywności Sphk1 oraz w stresie oksydacyjnym, wywołanym MPP⁺. Inkubacja komórek z MPP⁺, podobnie jak z SKI II, zwiększa poziom mRNA pro-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2: *hrk* i *bax*. Wzrost ekspresji *bax* w komórkach dopaminergicznych w warunkach stresu MPP⁺ oraz w zwierzęcych modelach ChP wykazano w licznych badaniach (Hassouna i wsp. 1996; Khwanraj i wsp. 2015; You i wsp. 2016; Zhao i wsp. 2016). Z kolei poziom ekspresji i rola białka Hrk w komórkowych i zwierzęcych modelach ChP jest zagadnieniem dotychczas niepoznanym. Wiadomo natomiast, że białko Bax zapoczątkowuje proces apoptozy, wpływając na zmianę potencjału i przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej. Kolejno dochodzi do wypływu mitochondrialnych białek, m.in cytochromu c do cytoplazmy. W wyniku interakcji z czynnikiem Apaf-1 i prokaspazą-9, w obecności ATP uruchamiana zostaje aktywacja kaspaz wykonawczych, w tym kaspazy-3 (Cain i wsp.

2002; Scorrano i wsp. 2002). Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, dysfunkcja mitochondriów jest kluczowym etapem śmierci komórki zarówno w warunkach stresu wywołanego MPP+, jak również w ChP. W niniejszych badaniach zaobserwowano znaczne obniżenie immunoreaktywności cytochromu c we frakcji mitochondrialnej komórek traktowanych inhibitorem Sphk1, co świadczy o jego uwolnieniu do cytoplazmy. Uwalnianie tego pro-apoptotycznego białka z mitochondriów zostało potwierdzone w wielu badaniach w modelu MPTP/MPP+ (Cassarino i wsp. 1999; Liu i wsp. 2015; Wang i wsp. 2015; Chaudhuri i wsp. 2016). Wykazano, że nadekspresja Sphk1 lub egzogennie podawany S1P w mechanizmie hamowania uwalniania pro-apoptotycznych białek (cytochrom c, Smac/DIABLO) z mitochondriów chroni komórki przed apoptozą (Bonhoure i wsp. 2008; Cuvillier i Levade 2001). Istotnym markerem apoptotycznej śmierci komórek SH-SY5Y w warunkach inhibicji Sphk1 i stresu wywołanego MPP+ jest obecność fragmentu jądrowego enzymu polimerazy poli(ADP-rybozy) – PARP-1. PARP-1 (o masie cząsteczkowej 113. kDa u ssaków) jest preferencyjnym substratem dla wykonawczej kaspazy-3, a obecność ciętego fragmentu PARP-1 o ciężarze 89 kDa świadczyć może o procesie apoptozy. Cięcie PARP-1 z udziałem kaspazy-3 odgrywa rolę w śmierci komórek w przebiegu niedokrwienia mózgu, ChA, SM, ChP, urazowego uszkodzenia mózgu oraz nowotworów mózgu (Bhaskara i wsp. 2009; Chaitanya i Babu 2009; Kanthasamy i wsp. 2006; Lau i wsp. 2006; Peng i wsp. 2002). Obecność fragmentu PARP-1 o ciężarze 89 kDa, a także wzrost poziomu ceramidu w warunkach inkubacji komórek z SKI II zaobserwowano w badaniach Loveridge i wsp. (2010). Degradacja PARP-1 przez kaspazę-3 towarzyszy także warunkom stresowym, wywołanym MPP+ (Kitamura i wsp. 1998; Lee i wsp. 2011a). W przedstawionych w rozprawie badaniach wykazano, że łączne potraktowanie komórek SKI II oraz MPP+ skutkuje dodatkowym obniżeniem poziomu immunoreaktywności PARP-1 (113 kDa) oraz jednoczesnym wzrostem immunoreaktywności fragmentu o ciężarze 89 kDa, w porównaniu do działania wykazanego dla każdego z tych związków z osobna. Stwierdzono także, że inhibitor kaspazy-3, która odpowiada za cięcie PARP-1 istotnie zwiększa żywotność komórek SH-SY5Y inkubowanych z MPP+, jednak w stopniu niższym niż S1P (1 μ M).

Istotną rolę w mechanizmie śmierci komórek w warunkach inhibicji Sphk1 odgrywa białko α -synukleina (ASN). Wykazaliśmy, że obniżenie aktywności Sphk1 wywołuje uwalnianie ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Pyszko i Strosznajder

2014b, Pyszko i Strosznajder 2014c). Ponadto, egzogennie dodawana ASN w formie natywnej i zmutowanej powoduje znaczne obniżenie aktywności Sphk1 (Pyszko i Strosznajder 2014b, Pyszko i Strosznajder 2014c). Wzajemna interakcja między egzogenną ASN, a obniżoną aktywnością Sphk1 prowadzić może do nasilenia uwalniania i toksycznego działania ASN oraz śmierci komórek nerwowych.

Istnieje niewiele badań dotyczących pro-życiowej roli aktywacji Sphk1 i protekcyjnej funkcji sygnału przekazywanego za pośrednictwem receptorów dla S1P (S1PR). Agoniści i modulatory tych receptorów mogą odgrywać istotną rolę w farmakoterapii chorób neurodegeneracyjnych. Do chwili obecnej jedynym stosowanym u ludzi modulatorem S1PR jest fingolimod (FTY720) - agonista wszystkich receptorów S1P z wyjątkiem S1PR2, który jest pierwszym doustnym lekiem immunosupresyjnym w SM (Brinkmann i wsp. 2010). Obniżony poziom ekspresji i aktywności Sphk1 wykazany w niniejszej rozprawie, wskazywać może na obniżenie poziomu S1P i jego istotną rolę w modelach ChP. W kolejnym etapie badań udowodniono, że dodany zewnątrzkomórkowo S1P w znamienym stopniu chroni komórki SH-SY5Y przed zmianami molekularnymi wywołanymi MPP+ oraz zwiększa ich żywotność. Aktywny sfingolipid zastosowano w stężeniu 1 μ M, które jest minimalnym stężeniem zwiększającym żywotność znamiennej puli komórek w powyższych warunkach. Jest to jednocześnie wartość zbliżona do fizjologicznego stężenia S1P w tkance mózgowej, która odpowiada około 10 nmol S1P/mg tkanki. Badania He i wsp. (2010) wykazały, że stężenie S1P w istocie szarej kory ciemieniowo-skroniowej pacjentów z ChA wynosiło około 5 nmol S1P/mg tkanki, natomiast u pacjentów kontrolnych w tym samym wieku około 12 nmol S1P/mg tkanki. Pro-życiowe właściwości egzogenego S1P pokazały po raz pierwszy badania Cuvillier i Levade (2001), gdzie w warunkach stresu wywołanego C2-ceramidem egzogeny S1P chronił komórki HL-60, U937 oraz Jurkat T przed śmiercią. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na komórkach SH-SY5Y (Czubowicz i Strosznajder 2014). Nasze badania wykazały, że inkubacja komórek SH-SY5Y z tym aktywnym sfingolipidem zmniejsza poziom wolnych rodników w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego MPP+, a także zwiększa żywotność znamiennej puli komórek. Protekcyjne działanie S1P wykazano w innych komórkowych modelach stresu oksydacyjnego tj. w fotoreceptorach, ludzkich komórkach ziarnistych oraz komórkach śródbłonna aorty bydlęcej poddanych działaniu nadtlenu wodoru (Rotstein i wsp. 2010; Moriue i wsp. 2008; Nakahara i wsp. 2012).

Wyniki zamieszczone w rozprawie wykazały, że w mechanizm protekcyjnego działania egzogenego S1P może być zaangażowany wzrost ekspresji/poziomu białka Sphk1. S1P zwiększa poziom mRNA *sphk1* w warunkach 3 i 12-godzinnej inkubacji z MPP+. Do pobudzenia ekspresji kinazy Sphk1 przez jej substrat może dochodzić w mechanizmie sprzężenia zwrotnego dodatniego, który znajduje potwierdzenie w przypadku regulacji poziomu mRNA *sphk1* w komórkowym modelu nefropatii cukrzycowej. W warunkach wysokiego stężenia glukozy zostaje aktywowany czynnik transkrypcyjny AP-1, który promuje ekspresję Sphk1. S1P produkowany przez Sphk1 może kolejno, w mechanizmie zależnym od pobudzenia swych receptorów, uruchamiać kaskadę zdarzeń, które ostatecznie prowadzą do aktywacji czynnika AP-1, który zwiększa ekspresję Sphk1, zwiększając tym samym poziom S1P (Huang i wsp. 2014). Jak wykazały moje badania, pro-życiowy mechanizm działania S1P wyraża się również przez jego wpływ na ekspresję białek pro-apoptotycznych z rodziny Bcl-2. S1P (1 μ M) powoduje znaczne obniżenie poziomu mRNA białek *hrk* oraz białka *bax*, który w warunkach stresu wywołanego MPP+ ulega znamienemu wzrostowi. Obniżenie ekspresji Hrk w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu S1P (1 μ M) zaobserwowano w stresie oksydacyjnym, wywołanym C2-ceramidem (Czubowicz i Strosznajder 2014). Badania Sauer i wsp. (2005) oraz Czubowicz i wsp. (2014) wykazały, że zewnątrzkomórkowy S1P nie ma wpływu na poziom mRNA białka *bax*, natomiast zwiększa ekspresję genu *bcl-2*, zmniejszając tym samym stosunek *bax/bcl2*, który jest istotną miarą potencjału pro-apoptotycznej komórki. W niniejszych badaniach, w komórkach SH-SY5Y traktowanych MPP+ egzogeny S1P również zmniejszał iloraz *bax/bcl2*, który jest istotnym kryterium pro-życiowej funkcji tego sfingolipidu.

Analizując mechanizm działania S1P przede wszystkim uwzględniono jego działanie receptorowe. Zastosowano agonistów i modulatora (P-FTY720) oraz antagonistów poszczególnych receptorów dla S1P. W niniejszej pracy wykazano aktywację szlaku przekąźnictwa zależnego od receptora pierwszego S1PR1. W stopniu porównywalnym do S1P protekcyjny efekt wykazują agoniści receptorów dla S1P: SEW2871 (10 μ M), który jest agonistą receptora pierwszego oraz analog S1P, czyli fingolimod w formie ufosforylowanej (FTY720-P, 100 pM), który stymuluje wszystkie typy receptorów S1P z wyjątkiem S1PR2. Warto zaznaczyć, że FTY720-P w analizie żywotności komórek wykazuje działanie protekcyjne w stężeniu 10 tys. razy niższym niż sam S1P (1 μ M), co prawdopodobnie związane jest z dużo wyższym powinowactwem

P-FTY720 do receptorów S1P, zwłaszcza do S1PR1. FTY720-P stosowany w tym samym stężeniu (100 pM) wykazywał neuroprotektoryjne właściwości w stresie wywołanym ceramidem i stresie oksydacyjno-metabolicznym wywołanym zaburzeniami stężenia glukozy w medium hodowlanym (Czubowicz i Strosznajder 2014; Czubowicz i wsp. 2014). W stężeniu pikomolarnym FTY720-P zapobiegał śmierci pierwotnych mysich neuronów traktowanych peptydami A β (Doi i wsp. 2013). Wyższe o rząd wielkości stężenie nanomolarne tego analogu S1P zastosowano w hodowli neuronalnych komórek hipokampa, gdzie związek chronił komórki przed apoptozą indukowaną przez promieniowanie (Stessin i wsp. 2012). W przeprowadzonych w niniejszej rozprawie doświadczeniach egzogeny S1P wywiera efekt w mechanizmie zależnym od pobudzenia receptora S1PR1. Pozytywny wpływ tego sfingolipidu na żywotność komórek SH-SY5Y znoszony jest przez W123, który jest specyficznym antagonistą S1PR1. Udział S1PR1, ale także S1PR3 w przekazywaniu sygnału pro-życiowego przez S1P wykazano w tej samej linii komórkowej (SH-SY5Y) w warunkach stresu wywołanego C2-ceramidem, a także w komórkach HT22 w warunkach stresu wywołanego brakiem glukozy z następującym jej wyrównaniem (ang. glucose deprivation/glucose reload GD/GR). W obydwu przypadkach FTY720-P wywierał protekcyjny efekt (Czubowicz i Strosznajder 2014; Czubowicz i wsp. 2014). Podobnie Nakahara i wsp. (2012) zaobserwowali zahamowanie procesu apoptozy i równoczesny wzrost aktywności pro-życiowej kinazy Akt pod wpływem działania egzogenego S1P, który swój efekt wywierał w mechanizmie pobudzenia receptorów S1PR1 i S1PR3 w ludzkich komórkach ziarnistych w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego nadtleniem wodoru. Gąssowska i wsp. (2014) zaobserwowali natomiast, że neuroprotektoryjna rola S1P w komórkach PC12 transfekowanych APP dodatkowo poddanych działaniu inhibitora Sphk1 jest niezależna od pobudzenia receptorów S1P. Kolejno, w niniejszej rozprawie zbadano poziom ekspresji receptora S1PR1 (gen kodujący *s1p1*), który najliczniej występuje w komórkach nerwowych. Poziom mRNA receptora *s1p1* w warunkach stresu MPP+ nie ulegał zmianie. Ponadto, inkubacja komórek z samym S1P (1 μ M) zwiększała poziom mRNA *s1p1* powyżej poziomu kontrolnego, co wskazuje na możliwość działania S1P w mechanizmie zależnym od receptora pierwszego.

S1P jest związkiem niestabilnym, którego okres półtrwania we krwi po podaniu dożylnym wynosi około 1 sekundy. Wobec powyższego do doświadczeń *in vivo* wybrano analog sfingozyny, czyli FTY720 (nazwa handlowa Gilenya TM). Jego wprowadzenie

do terapii SM jest do tej pory największym osiągnięciem w dziedzinie badań nad neuroprotekcijnymi właściwościami sfingolipidów. Pacjenci leczeni długotrwale FTY720 wykazują zmniejszoną utratę objętości mózgu przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby nawrotów choroby i znacznym spowolnieniu postępu niepełnosprawności (Radue i wsp. 2012). Oprócz dobrze poznanego mechanizmu immunosupresyjnego działania, w którym FTY720 uniemożliwia migrację limfocytów T z węzłów chłonnych do OUN, istnieje możliwość wiązania jego aktywnej ufosforylowanej przez Sphk2 postaci (FTY720-P) z receptorami S1P obecnymi w OUN (Kharel i wsp. 2005; Brinkmann i wsp. 2010). Mechanizm działania FTY720 na poziomie molekularnym nie jest w pełni wyjaśniony. Hait i wsp. (2014) wykazali, że FTY720 podobnie jak S1P poprzez hamowanie deacetylazy histonowej (HDAC1) zwiększa ekspresję genów związanych z procesami uczenia się i pamięci. Ponadto wykazano, że FTY720-P zmniejsza aktywację procesu zapalnego w mikrogleju oraz zwiększa syntezę czynników troficznych (Noda i wsp. 2013). Badania Deogracias i wsp. (2012) prowadzone w mysim modelu zespołu Retta wykazały, że podawanie FTY720 powoduje wzrost poziomu czynnika BDNF oraz zmniejsza stopień uszkodzenia prądkowia, którym towarzyszy obniżenie niepełnosprawności ruchowej zwierząt. FTY720-P wykazuje również właściwości neuroprotekcyjne w modelu *in vitro* ChA. Badania Takasugi i wsp. (2013) wykazały, że FTY720, fosforylowany przez Sphk2 zmniejsza syntezę toksycznych peptydów A β w pierwotnej hodowli neuronów hipokampa. Mechanizm jego działania był w tym przypadku niezależny od pobudzenia receptorów dla S1P. Doi i wsp. (2013) wykazali, że FTY720-P wywiera efekt neuroprotekcyny zależny od stężenia (1-100 pM) w pierwotnej hodowli neuronów korowych, poddanej działaniu toksycznych oligomerów A β (1-42). W mechanizmie jego działania zaangażowana była kinaza ERK1/2 oraz zależny od niej wzrost ekspresji czynnika BDNF. Związek działa neuroprotekcynie także w eksperymentalnym modelu autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia oraz doświadczalnym urazie rdzenia kręgowego (Seki i wsp. 2013; Norimatsu i wsp. 2012). W doświadczeniach prezentowanych w rozprawie, FTY720 był podawany myszom w dawce 1mg/kg mc 1 godz. po ostatniej iniekcji MPTP, a następnie przez 10 kolejnych dni. Działanie FTY720 w modelu *in vivo* ChP nie było do tej pory badane, jednak dawkę 1mg/kg mc stosowano w innych zwierzęcych modelach doświadczalnych. W zwierzęcym modelu ChA, wywołanym podawaniem toksycznych oligomerów A β (1-42) bezpośrednio do hipokampa, FTY720 (w dawce 1 mg/kg mc podawanej dootrzewnowo przez 14 dni)

obniżał aktywność kaspazy-3 i zmniejszał stopień uszkodzenia neuronów hipokampa, którym towarzyszyła poprawa procesów uczenia się i pamięci (Asle-Rousta i wsp. 2013). W badaniach Czech i wsp. (2009) oraz Pfeilschifter i wsp. (2011) FTY720 podawany myszom C57BL/6 w dawce 1 mg/kg mc, odpowiednio bezpośrednio przed i po wywołaniu ischemii, powodował zmniejszenie rozmiaru uszkodzenia mózgu i poprawę funkcji neurologicznych. Anastasiadou i Knöll (2016) wykazali, że FTY720 (1mg/kg mc) zwiększa regenerację aksonów u myszy z porażeniem nerwu twarzowego. Ponadto, ostatnie badania ujawniły nowe właściwości FTY720, który w dawce 1 mg/kg oraz niższej - 0,3 mg/kg wywiera korzystny wpływ na proces endogennej naprawy zdmielinizowanych komórek w mysim modelu demielinizacji wywołanej lizolecytyną (Yazdi i wsp. 2015). Pojedyncza dawka FTY720 (1 mg/kg mc) w modelu toksyczności tlenowej u noworodków szczurzych wywiera neuroprotektoryjny efekt, który częściowo chroni komórki istoty białej i zapobiega zaburzeniom neuropoznawczym w dorosłym życiu (Serdar i wsp. 2016).

W niniejszej pracy, rola FTY720 w zwierzęcym modelu ChP została porównana z lekiem obecnie stosowanym w terapii tej choroby – pramipeksolem (PPX). Związek ten jest wybiórczym agonistą receptorów dopaminowych D2 i D3, przy czym ośmiokrotnie większe powinowactwo wykazuje do receptorów D3 (Merlo i wsp. 2011). Stosowany jest w monoterapii lub leczeniu skojarzonym z lewodopą w zaawansowanej, idiopatycznej ChP oraz w objawowym leczeniu umiarkowanego i ciężkiego zespołu niespokojnych nóg (Bassetti i wsp. 2011). W ostatnim dziesięcioleciu liczne badania wykazują także korzystny efekt PPX w leczeniu depresji pacjentów z ChP a także w zwierzęcych modelach depresji (Rektorová i wsp. 2005; Kano i wsp. 2008; Berghauzen-Maciejewska i wsp. 2015). Wybór PPX do badań *in vivo* podyktowany był jego właściwościami neuroprotektoryjnymi, wykazanymi w badaniach żywotności komórek SH-SY5Y, które w warunkach silnego stresu oksydacyjnego wywołanego MPP+ (3 mM) były odporne na działanie większości neuroprotektantów. Antyoksydacyjne i neuroprotektoryjne właściwości PPX wykazano również w modelach *in vitro/in vivo* ChP i ChA oraz w badaniach klinicznych (Bennett i wsp. 2015; Lauterbach i wsp. 2010; Chau i wsp. 2013). W przeprowadzonej przez nas analizie żywotności komórek SH-SY5Y traktowanych MPP+, PPX wywierał działanie protekcyjne w stężeniach mikromolowych. Efektywne stężenie PPX jakie stosowaliśmy w niniejszej pracy jest wyższe od dotychczas podawanych w literaturze, co tłumaczyć można niską ekspresją receptorów D2/D3

w stosowanym modelu eksperymentalnym z zastosowaniem nieróżnicowanych komórek SH-SY5Y. W dostępnych wynikach badań z innych ośrodków wartość EC_{50} dla PPX jest niższa i wynosi około 70 μM (Presgraves i wsp. 2004) a nawet 6,4 μM (Joyce i wsp. 2003) w tych samych warunkach stresowych, ale prowadzonych w różnicowanych komórkach SH-SY5Y. W badaniach przedstawionych w rozprawie zastosowano aktywną lewoskrętną postać S(-)PPX, która wykazuje wyższe powinowactwo do receptorów D2/D3. PPX działać może też w mechanizmie niezależnym od receptorów zarówno jako lewoskrętny, jak i prawoskrętny stereoizomer, który nie jest agonistą receptorów dopaminergicznych (Ferrari-Toninelli i wsp. 2010). Zarówno R(+), jak i S(-) stereoizomer pramipeksolu hamuje kaspazo-zależną apoptotyczną śmierć komórek SH-SY5Y wywołaną działaniem MPP⁺, peptydów A β oraz rotenonu (Abramova i wsp. 2002; Gu i wsp. 2004). Zablokowanie receptorów D2/D3 nie znosi protekcyjnego działania R (+) i S (-) pramipeksolu, co jest dowodem na mechanizm działania na drodze pozadopaminergicznej, który jest jednak zależny od stosowanych warunków doświadczalnych (Presgraves i wsp. 2004; Abramova i wsp. 2002; Gu i wsp. 2004). W stosowanym w niniejszej pracy protokole doświadczalnym PPX i FTY720 podano w identycznym schemacie 1 mg/kg mc/ 24 godz. na godzinę po ostatniej iniekcji MPTP oraz przez dziesięć kolejnych dni. Dootrzewnowa dawka PPX 1mg/kg mc ma udowodnione działanie neuroprotekcyjne w toksyczności MPTP (Kitamura i wsp. 1997; Zou i wsp. 2000). Dawka ta jest 10-30-krotnie niższa w porównaniu do apomorfiny i bromokryptyny, agonistów dopaminergicznych o niskim powinowactwie do receptorów D3 (Grünblatt i wsp. 1999; Muralikrishnan i Mohanakumar 1998). Dawka 1 mg/kg mc podana dootrzewnowo u myszy jest jednak o wiele wyższą dawką niż 1,5 mg leku podawanego doustnie u człowieka. Poziom PPX w surowicy obserwowany po doustnym podaniu 1,5 mg PPX odpowiada 0,1-0,5 mg/kg mc u myszy. Kilka badań potwierdza neuroprotekcyjny efekt niskiej dawki 0,1 mg/kg mc PPX w toksyczności MPTP u myszy (Joyce i wsp. 2004; Ramirez i wsp. 2003).

W niniejszej rozprawie ocena właściwości neuroprotekcyjnych FTY720 i PPX w modelu toksyczności MPTP u myszy została wykonana w oparciu o badanie poziomu immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH-IR) w prądkowiu myszy poddanych iniekcji MPTP. Pomiar poziomu TH-IR jest powszechną techniką identyfikacji właściwości neuronów zdolnych do syntezy DA. Stopień obniżenia poziomu TH-IR w całkowitym prądkowiu jest uznany jako marker stopnia zaniku zakończeń neuronów

dopaminergicznych w tej strukturze mózgu (Stephenson i wsp. 2007). Pomiar poziomu TH-IR jest również uznaną w literaturze techniką weryfikacji uszkodzeń wywołanych toksyną MPTP na poziomie prądkowia (Chagniel i wsp. 2012; Pain i wsp. 2013). W przedstawionych w rozprawie wynikach wykazano 65% obniżenie poziomu TH-IR w prądkowiu myszy poddanych działaniu MPTP w porównaniu do myszy kontrolnych, co wskazuje na nieznacznie silniejszy stopień uszkodzenia prądkowia w porównaniu do badań Chalimoniuk i wsp. (2006) Chagniel i wsp. (2012) oraz Pain i wsp. (2013), w których uzyskano 40% obniżenie TH-IR w tej części mózgu w tym samym, bądź zbliżonym schemacie ostrej toksyczności MPTP. Zastosowany protokół podawania toksyny MPTP był identyczny jak w badaniach Chalimoniuk i wsp. (2006), którzy wykazali 55, 62, i 66% obniżenie liczby TH-immunopozytywnych neuronów w części zbitej istoty czarnej (SNpc), odpowiednio w 3, 7 i 14 dniu po podaniu MPTP (w sumarycznej dawce 40 mg/kg mc). Weryfikacji modelu dokonano także w oparciu o badania Breckenridge i wsp. (2013), które wykazały, że MPTP w dawce 10 mg/kg mc podany w 4 iniekcjach w ciągu jednego dnia znacznie obniża poziom DA (~75-90%), poziom DOPAC (~60-80 %) i HVA (~45-70 %) w prądkowiu myszy. W niniejszej rozprawie wykazano, że po podaniu FTY720 oraz PPX poziom TH-IR w prądkowiu myszy poddanych działaniu MPTP ulegał podwyższeniu i wynosił on odpowiednio 90% oraz 80% wartości kontrolnej. Wynik ten po raz pierwszy pokazuje protekcyjny efekt FTY720 w zwierzęcym modelu ChP. Neuroprotekcyjny potencjał tego związku został potwierdzony u pacjentów z SM oraz w licznych modelach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo* innych chorób neurologicznych. Zagadnienie to zostało omówione we wprowadzeniu, w części „Działanie fingolimodu w układzie nerwowym”. Badania zaprezentowane w rozprawie wykazały, że zastosowanie analogu sfingozyny w większym stopniu zapobiega obniżeniu poziomu TH-IR w prądkowiu myszy aniżeli PPX, który jest związkiem o uznanych w literaturze właściwościach protekcyjnych. Dla przykładu, badania Joyce i wsp. (2003,2004) wykazały, że PPX w niskiej dawce (0,1 mg/kg mc) całkowicie znosił indukowaną przez MPTP utratę komórek w rejonie istoty czarnej i pola brzusznej nakrywki liczoną jako TH-IR oraz obniżenie poziomu DAT w prądkowiu. Mechanizm protekcyjnego działania PPX nie jest jednak w pełni wyjaśniony.

W niniejszej pracy podjęliśmy próbę wyjaśnienia protekcyjnego działania FTY720, który jako analog sfingozyny może regulować aktywność kluczowych enzymów, biorących udział w utrzymaniu biostatu sfingolipidowego (S1P/ceramid)

i wpływać na proces przeżycia /śmierci komórki. Związek ten posiada udokumentowaną zdolność inhibicji zarówno Sphk1, która syntetyzuje S1P (Paugh i wsp. 2003), jak i zdolność *in vivo* (w dawce 1mg/kg mc) inhibicji liazy S1P, która degradowuje ten aktywny lipid (Bihuvula i wsp. 2005). Badania Berdyshev i wsp. (2009) wykazały, że FTY720 jest kompetencyjnym inhibitorem drugiej syntazy ceramidu (CerS2, wartość IC_{50} *in vitro* 6,4 μ M). Związek ten może hamować także pozostałe CerSs, lecz z mniejszą skutecznością. Wymagana jest w tych warunkach aktywność Sphk1, co potwierdzono stosując wyciszenie ekspresji genów dla poszczególnych izoform Sphk. W niniejszych doświadczeniach FTY720 podawany myszom kontrolnym nie wykazywał wpływu na aktywność, poziom ekspresji i poziom białka Sphk1, jednak jego podanie myszom, które otrzymały MPTP znosiło hamujące działanie toksyny na poziom mRNA *sphk1* w śródmózgowiu myszy. W aktywacji ekspresji Sphk1 przez FTY720 w mysim modelu ChP może brać udział zależna od pobudzenia receptorów S1P aktywacja odpowiednich czynników transkrypcyjnych (Huang i wsp. 2014). Mechanizm aktywacji ekspresji Sphk1 przez FTY720 nie został jednak w pełni wyjaśniony. PPX wywiera efekt stymulujący ekspresję Sphk1 w stopniu porównywalnym do FTY720. Dodatkowo PPX zwiększa znamienne poziom aktywności tego enzymu, który ulegał znamienne obniżeniu w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Pozytywny wpływ PPX na aktywność kinazy Sphk1 może być nowym mechanizmem działania leku, niezależnym od aktywacji układu dopaminergicznego.

Kilka badań, w tym badania naszego zespołu pokazuje, że pro-życiowym szlakiem aktywowanym przez PPX jest kinaza Akt. Presgraves i wsp. (2004) zaobserwowali obniżenie protekcyjnych właściwości PPX (100 μ M) *in vitro* w stresie wywołanym MPP+ w warunkach farmakologicznej inhibicji PI3K-Akt. W badaniach *in vivo* przedstawionych w niniejszej rozprawie zarówno PPX, jak i FTY720 zwiększały fosforylację (na Ser 473), a tym samym aktywność pro-życiowej kinazy Akt w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Ponadto FTY720 zwiększał zależną od kinazy Akt fosforylację pro-apoptotycznego białka Bad. Fosforylacja białka Bad na Ser 136 powoduje jego związanie się z białkiem adaptorowym 14-3-3 i sekwestrację w cytoplazmie, uniemożliwiając mu interakcje z pro-życiowym białkiem Bcl-xL. W konsekwencji nie dochodzi do uwalniania cytochromu c z mitochondriów i aktywacji procesu apoptozy, zależnej od Bad (Masters i wsp. 2001). Mechanizm ten może tłumaczyć protekcyjną rolę zarówno FTY720, jak i PPX. Badania Cassarino i wsp. (1998)

pokazują zdolność PPX do hamowania produkcji RFT zarówno w nieróżnicowanych komórkach SH-SY5Y, jak i w prążkowie szczura, a także zależny od dawki PPX, pozytywny wpływ na stabilizację błony mitochondrialnej poprzez uniemożliwienie działania białka Bad. Ponadto liczne badania wykazały, że zarówno PPX, jak i FTY720 aktywują czynnik troficzny BDNF oraz zależną od niego kinazę Akt (Berghauzen-Maciejewska i wsp. 2015; Li i wsp. 2010; Du i wsp. 2005; Imamura i wsp. 2008; Merlo i wsp. 2011; Doi i wsp. 2013; Deogracias i wsp. 2012; Noda i wsp. 2013; Sastry i Rao 2000). W niniejszych badaniach wykazano także znamienne wzrost ekspresji białka *bax* w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP, co pozostaje w zgodzie z badaniami w komórkowym modelu z użyciem toksyny MPP+. Podanie PPX obniża podwyższony poziom mRNA *bax* w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Obniżenie poziomu mRNA białka *bax* i wzrost ekspresji *bcl-2* w modelu ChP, indukowanym MPTP wykazano we wcześniejszych badaniach (Shin i wsp. 2009)

W modelu toksyczności ostrej zaobserwować można zależny od dawki MPTP ubytek neuronów dopaminergicznych w prążkowie, który jednak nie zawsze koreluje z trwałym zaburzeniem zdolności lokomotorycznych myszy (Chagniel i wsp. 2012). W przedstawionych badaniach aktywność motoryczna mierzona była w teście otwartego pola i kolejno w teście Rotarod, które są powszechnie wykorzystywane do oceny aktywności motorycznej zwierząt w modelu toksyczności MPTP. Badania nie wykazały trwałych deficytów ruchowych w warunkach swobodnej lokomocji, poziomu eksploracji i lęku, mierzonych testem otwartego pola. W ocenie uwzględniono następujące parametry: całkowity dystans, czas przebywania i ilość wejść do strefy centralnej oraz czas ruchu/bezruchu. Spontaniczna aktywność ruchowa mierzona w teście otwartego pola nie jest zależna wyłącznie od podanej dawki MPTP, stopnia uszkodzenia neuronów dopaminergicznych i obniżenia poziomu DA w prążkowie, choć niektóre badania wykazują między nimi wyraźną korelację (Fredriksson i Archer 1994; Tadano i wsp. 1987). Aktywność motoryczna zależy od wielu dodatkowych czynników, m.in. szczepu myszy, ich wieku, płci, masy ciała, drogi podania MPTP i czasu jaki upłynął od podania toksyny do wykonania pomiaru. Badania Tomac i wsp. (1995) i Fredriksson i wsp. (1999) pokazują, że przy zastosowaniu tego samego schematu toksyczności MPTP u myszy szczepu C57BL/6, oraz uzyskaniu podobnego obniżenia poziomu DA w prążkowie (ok. 80 %), aktywność myszy mierzona w piątym dniu po podaniu MPTP nie ulegała zmianie, podczas gdy po trzech tygodniach zaobserwowano

wyraźne obniżenie aktywności lokomotorycznej. Z kolei w badaniach Chia i wsp. (1996), w których wykorzystano ten sam szczep C57BL/6, jednak osobniki o 2-4 tygodnie młodsze, mimo podania większej dawki MPTP, zaobserwowano zwiększoną aktywność ruchową myszy z grupy MPTP względem kontrolnych. Badania te pokazują, że przy zachowaniu tych samych lub zbliżonych warunków doświadczalnych obniżenie aktywności lokomotorycznej nie jest powtarzalne i nie jest pełnym odzwierciedleniem stopnia uszkodzenia neuronów dopaminergicznych i obniżenia poziomu DA w prążkowie. Brak obserwowanych różnic, rehabilitacja ruchowa myszy oraz wzrost lokomocji wynikać mogą z funkcjonalnego wyrównania zaburzeń układu dopaminergicznego przez układ serotonergiczny. Badania Mitra i wsp. (1992) pokazują, że poziom serotoniny (5HT) w istocie czarnej, prążkowie, układzie limbicznym, mózgdzku i rdzeniu przedłużonym były podwyższone trzy godziny po podaniu pojedynczej dawki MPTP. Zgodnie z powyższym, wzrastał także metabolizm 5HT po podaniu MPTP (Chia i wsp. 1996). Ponadto nadmierną aktywność ruchową indukowaną MPTP znosiło podanie neurotoksyny serotonergicznej (Chia i wsp. 1999). Należy oczekiwać, że brak zmian w przeprowadzonym w niniejszej pracy teście jest wynikiem funkcjonalnej kompensacji układu pozapiramidowego, która ma miejsce kilka dni po podaniu MPTP i może prowadzić do braku reakcji lub nadmiernej aktywności ruchowej myszy poddanych iniekcji MPTP, względem tych którym podano sól fizjologiczną. W badaniach Ferger i wsp. (2000), gdzie zastosowano schemat jednodniowego podania MPTP (podskórnie w sumarycznej dawce 40 mg/kg mc) 3-miesięcznym myszom szczepu C57BL/6, w pierwszym dniu eksperymentu odnotowano 85 % obniżenie poziomu lokomocji. W przedstawionych w niniejszej rozprawie doświadczeniach z wykorzystaniem tego samego szczepu i dawki toksyny (podanej dootrzewnowo) nie zaobserwowano zmian aktywności ruchowej w jedenastym dniu eksperymentu. W kilku punktach czasowych całkowity przebyty dystans ulegał wydłużeniu w grupie myszy MPTP poddanych działaniu FTY720 lub PPX względem myszy z grupy MPTP. Mając na uwadze brak różnicy między tą ostatnią grupą a kontrolą, zmiany uznano za nieistotne. Zaobserwowano natomiast istotne zmiany zarówno między grupami MPTP i kontrolną oraz MPTP i stosowanymi związkami farmakologicznymi w teście Rotarod, który umożliwia badanie wymuszonej aktywności motorycznej myszy po jej umieszczeniu na obrotowym pręcie z liniowo wzrastającą prędkością. Odnotowano znamienne w trzynastym oraz czternastym dniu eksperymentu skrócenie czasu

przebywania na obrotowym walcu w przypadku myszy z grupy MPTP w stosunku do grupy kontrolnej. Szybszy czas upadku myszy poddanych działaniu toksyny MPTP na obrotowej bieżni może być wynikiem nieprawidłowej koordynacji ruchowej, ale może być spowodowany również spowolnieniem ruchowym, gdyż test ten wymaga szybkiej i ciągłej adaptacji do wzrastającej szybkości obrotów ruchomego walca. Trzecim parametrem, jaki może wpływać na wynik testu jest sztywność kończyn tylnych, która sprawia, że trudno jest umieścić wszystkie cztery kończyny tak by utrzymać równowagę. Należy oczekiwać, że wynik testu Rotarod umożliwi ocenę zbiorczą stopnia deficytu wszystkich powyższych parametrów, które w teście wymuszonej aktywności ruchowej dają lepszy obraz zmian, zbliżony do zaburzeń obserwowanych u pacjentów w początkowych stadiach ChP (Sedelis i wsp. 2001). Według Chagniel i wsp. (2012) znamienne obniżenie aktywności ruchowej myszy w teście Rotarod obserwuje się gdy dochodzi do obniżenia poziomu TH-IR w prążkowie o 70 % względem kontrolnej wartości TH-IR. W niniejszych badaniach wykazaliśmy istotne 65 % obniżenia poziomu TH-IR, świadczące o znacznym uszkodzeniu neuronów prążkowie u myszy poddanych działaniu MPTP. W przeprowadzonym teście Rotarod podanie FTY720 i PPX we wszystkich trzech dniach eksperymentu skutkowało dłuższym czasem przebywania zwierząt na obrotowym walcu. Za znamienne uznano jedynie wynik z dwóch ostatnich dni eksperymentu z uwagi na istotne statystycznie obniżenie aktywności lokomotorycznej myszy z grupy MPTP w porównaniu z grupą kontrolną.

Podsumowując, wyniki analiz molekularnych wskazują na neuroprotektoryjne działanie FTY720, porównywalne z efektem PPX, wyrażone jako wzrost TH-IR w prążkowie myszy, wzrost ekspresji *sphk1*, fosforylacji/aktywności pro-życiowej kinazy Akt i zależnej od niej fosforylacji białka Bad w śródmózgowiu myszy w modelu ChP. Ponadto, w niniejszej rozprawie uzyskano wzrost aktywności lokomotorycznej myszy po podaniu FTY720, porównywalne z efektem PPX. Uzyskane wyniki mogą stać się pomocne w zrozumieniu roli FTY720 w modelu ChP i wskazują na zasadność dalszych badań nad działaniem tego leku zarówno w ChP, jak i innych chorobach neurodegeneracyjnych.

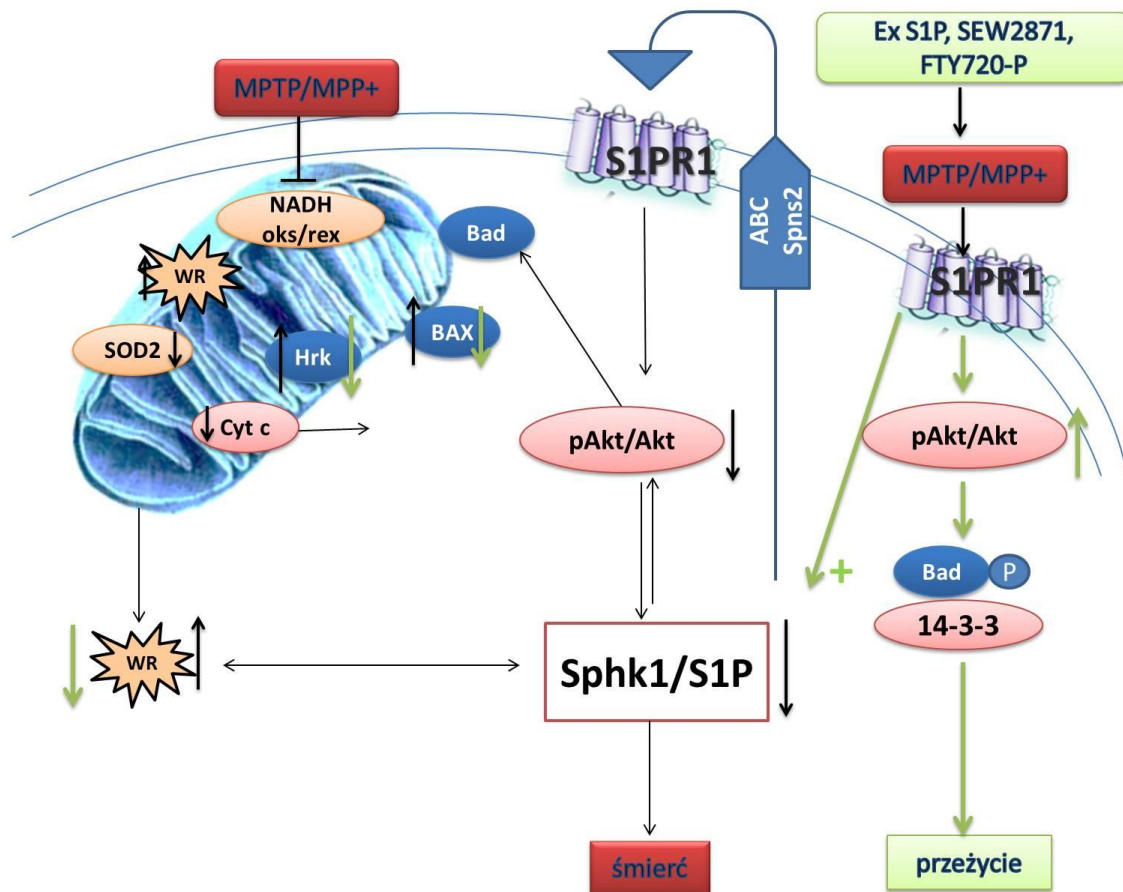
Podsumowanie

- 1) Wykazano, że wywołany działaniem toksyny MPP+ stres oksydacyjny powoduje obniżenie ekspresji/poziomu białka i aktywności Sphk1, wzrost ekspresji liazy S1P oraz wzrost poziomu wolnych rodników, obniżenie żywotności i apoptozę znaczącej puli komórek SH-SY5Y.
- 2) W warunkach farmakologicznego zahamowania aktywności Sphk1 stwierdzono obniżenie poziomu fosforylacji/aktywności pro-życiowej kinazy Akt, wzrost ekspresji białek pro-apoptotycznych Bax i Hrk, obniżenie poziomu immunoreaktywności cytochromu c we frakcji mitochondrialnej oraz wzrost immunoreaktywności fragmentu polimerazy PARP-1 o ciężarze 89 kDa.
- 3) Egzogeny S1P (1 μ M) powoduje wzrost ekspresji Sphk1, obniżenie poziomu wolnych rodników oraz ekspresji białek pro-apoptotycznych z rodziny Bcl-2. FTY720-P - modulator receptorów S1P oraz agonista receptora S1PR1 (SEW2871) zwiększają żywotność komórek SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+.
- 4) Wykazano obniżenie Sphk1 na poziomie ekspresji/immunoreaktywności i aktywności w śródmózgowiu myszy w zwierzęcym modelu ChP.
- 5) FTY720 i PPX (agonista receptorów D2/D3) zwiększają poziom immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH-IR) w prążkowie myszy oraz fosforylację/aktywność kinazy Akt i fosforylację białka Bad w śródmózgowiu myszy w modelu ChP. Obydwa związki poprawiają funkcję lokomotoryczną zwierząt.

Wnioski

- 1) Zaburzenie enzymów odpowiedzialnych za metabolizm S1P, obniżenie syntezy tego aktywnego lipidu i wzrost jego degradacji są istotne w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP⁺ w komórkach SH-SY5Y. Wyniki wskazują, że aktywacja Sphk1 oraz inhibicja lizy S1P mogą być punktem uchwytu w neuroprotekcji.
- 2) Farmakologiczne hamowanie aktywności Sphk1 powoduje, podobnie jak MPP⁺, zaburzenia procesów molekularnych i aktywację szlaku apoptozy, co wskazuje na istotne znaczenie Sphk1 w mechanizmie śmierci komórek neuronalnych SH-SY5Y w modelu ChP.
- 3) Działanie neuroprotektoryjne FTY720-P i SEW2871 wskazuje na istotne znaczenie aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od pobudzenia receptora S1PR1 w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP⁺ w komórkach neuronalnych SH-SY5Y.
- 4) Zmiany Sphk1 w zwierzęcym modelu ChP mogą w istotny sposób zaburzać przekazanie informacji zależne od pobudzenia receptorów S1P.
- 5) FTY720 wykazuje neuroprotektoryjny efekt porównywalny z PPX zarówno na poziomie molekularnym, jak i w ocenie aktywności lokomotorycznej zwierząt w modelu ChP. Wyniki wskazują na zasadność dalszych badań nad działaniem modulatorów/agonistów S1PR w modelach ChP.

Poniższy schemat obrazuje molekularne zmiany prowadzące do aktywacji szlaków przeżycia/śmierci komórek w modelu ChP, opracowane na podstawie wyników niniejszej rozprawy (Schemat 13.).



Schemat 13. Mechanizmy molekularne w procesie przeżycia i śmierci komórek w doświadczalnym modelu ChP oraz w neuroprotekcyjnym działaniu S1P wg danych uzyskanych w niniejszej pracy.

objaśnienia skrótów: MPTP/MPP⁺ - 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna/1-metylo-4-fenylpirydyna, S1P - sfingozyno-1-fosforan, Ex S1P - egzogeny S1P, S1PR1 - pierwszy receptor S1P, SEW2871 - agonista S1PR1, FTY720-P - ufosforylowany fingolimod, Sphk1 - kinaza sfingozyny 1, Akt - pro-życiowa kinaza, która jest kluczowym białkiem efektorowym szlaków zależnych od pobudzenia receptora S1PR1, Bax, Hrk, Bad - białka pro-apoptotyczne z rodziny Bcl-2, 14-3-3 - białko adaptorowe dla białka Bad, które powoduje jego sekwestrację w cytoplazmie, WR - wolne rodniki, SOD2 - mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa, NADH oks/red - dehydrogenaza NADH. Czarny kolor strzałek - działanie MPTP/MPP⁺. Zielony kolor strzałek - działanie agonistów S1PR1 w stresie oksydacyjnym MPTP/MPP⁺.

Streszczenie

Etiopatogeneza idiopatycznej Choroby Parkinsona (ChP) pomimo wieloletnich badań nie została w pełni wyjaśniona, a jej terapia pozostaje nieskuteczna. Poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za obumieranie neuronów w ChP jest istotnym wyzwaniem dla współczesnej nauki. W ostatniej dekadzie dokonał się ogromny postęp w zrozumieniu roli zaburzeń sfingolipidów w patogenezie/patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak stwardnienie rozsiane (*sclerosis multiplex*, SM) niedotlenienie/niedokrwienie mózgu, urazowe uszkodzenie mózgu czy Choroba Alzheimera (ChA). Badania ostatnich lat wskazują na udział zmian w homeostazie bioaktywnych sfingolipidów. W procesie tym kluczową rolę pełnią kinazy sfingozyny (Sphk1/2) (EC:2.7.1.91), które są konserwatywnymi enzymami lipidowymi, przeprowadzającymi fosforylację sfingozyny do sfingozyno-1-fosforanu (S1P). S1P syntetyzowany przez Sphk1 jest wysoce reaktywną cząsteczką, która wywiera działanie anty-apoptotyczne, bierze udział w regulacji procesów neurogenezy, różnicowania, migracji komórek oraz ich programowanej śmierci. S1P działa na komórkę w dwojaki sposób: jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik drugiego rzędu oraz jako przekaźnik pierwszego rzędu, za pośrednictwem pięciu receptorów błonowych sprzężonych z białkami G: S1PR1-5. Obie kinazy (Sphk1 i Sphk2) pełnią kluczową rolę w regulacji przeżycia/śmierci komórki poprzez utrzymywanie homeostazy aktywnych sfingolipidów, S1P oraz ceramidu. Lipidy te pełnią przeciwstawną funkcję odpowiednio anty i pro-apoptotyczną, co czyni enzymy syntetyzujące i degradujące S1P cennymi punktami uchwytu w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych wielu chorób. Wzrost poziomu S1P może wpływać na aktywację procesów nowotworzenia, natomiast obniżenie jego poziomu i jednoczesny wzrost stężenia ceramidu obserwowany jest w ChA oraz w przebiegu innych chorób neurodegeneracyjnych. Agonista receptorów S1P - fingolimod (FTY720) jest pierwszym doustnym lekiem immunosupresyjnym w SM. Znaczenie Sphk1/S1P w patologii ChP jest do chwili obecnej niewyjaśnione.

Celem rozprawy było zbadanie poziomu ekspresji i aktywność Sphk1 oraz jej udziału w mechanizmie śmierci komórek nerwowych. Ponadto badano potencjalne neuroprotektoryjne właściwości S1P, jego analogów oraz agonistów receptorów S1P w modelach doświadczalnych ChP.

Zastosowano chemiczny model ChP, wywołany toksyną 1-metylo-4-fenylopirydyną (MPP+) oraz jej prekursorem zdolnym przenikać barierę krew-mózg: 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP). Działaniu tej toksyny poddano odpowiednio ludzką linię komórkową *neuroblastoma* (SH-SY5Y) oraz dorosłe myszy szczepu C57BL/6. Celem pierwszej części moich badań była analiza poziomu ekspresji/aktywności enzymów metabolizujących S1P, ze szczególnym uwzględnieniem Sphk1 oraz ocena protekcyjnych właściwości i mechanizmu działania S1P w komórkach SH-SY5Y w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP+ (3 mM). Prezentowane w niniejszej pracy wyniki po raz pierwszy wykazały obniżenie poziomu ekspresji i aktywności Sphk1 oraz jednoczesny wzrost ekspresji liazy S1P w komórkowym modelu ChP. Wyniki wskazują na obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu tego aktywnego lipidu. Stwierdzono, że hamowanie aktywności Sphk1 powoduje wzrost poziomu wolnych rodników (WR) oraz indukuje procesy molekularne prowadzące do aktywacji apoptotycznej śmierci komórek. Stwierdzono, że w mechanizmie śmierci komórek wywołanej zarówno toksycznością MPP+, jak i farmakologicznym obniżeniem aktywności Sphk1 zaangażowane są procesy molekularne, prowadzące do wzrostu ekspresji białek pro-apoptotycznych (Bax i Hrk), obniżenia poziomu cytochromu c we frakcji mitochondrialnej oraz wzrostu aktywności kaspazy-3, której markerem jest obecność produktu proteolizy polimerazy poli(ADP-rybozy) PARP-1 o ciężarze 89 kDa. Uzyskane wyniki wskazują, że obniżenie ekspresji/aktywności Sphk1, a tym samym syntezy S1P może być kluczowym zjawiskiem w mechanizmie śmierci komórek w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego MPP+.

W kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ egzogenego S1P na żywotność komórek SH-SY5Y, poziom WR i wybrane procesy molekularne w warunkach toksyczności MPP+. Wykazano, że S1P (1 μ M) powoduje obniżenie poziomu WR i ekspresji pro-apoptotycznych białek Bax i Hrk, a także wzrost ekspresji Sphk1 i żywotności komórek SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+. Analiza żywotności komórek z udziałem agonistów i antagonistów poszczególnych typów receptorów S1P wykazała, że za cytoprotekcyjny efekt S1P w badanych warunkach stresowych odpowiada aktywacja przekąźnictwa zależnego od receptora S1PR1. Podobny efekt wykazuje analog S1P – FTY720 w formie ufosforylowanej (FTY720-P, 100 pM). Potencjalne neuroprotekcyjne właściwości FTY720 były przedmiotem badań drugiego etapu (*in vivo*) niniejszej rozprawy.

Celem badań w zwierzęcym modelu ChP była ocena działania neuroprotektynnego FTY720 - analogu sfingozyny i agonisty/modulatora wszystkich receptorów S1P z wyjątkiem S1PR2, na zmiany molekularne oraz na poziom immunoreaktywności hydroksylazy tyrozyny (TH) w prążkowiu i śródmózgowiu myszy oraz na aktywność motoryczną zwierząt. Efekt FTY720 porównywano z działaniem pramipeksolu (PPX) – agonisty receptorów D2/D3 i leku stosowanego w terapii ChP. Ponadto ważnym zagadnieniem było zbadanie ekspresji i aktywności Sphk1 w wybranych częściach mózgu myszy w modelu ChP. Badania dotyczyły również udziału pro-życiowej kinazy Akt i zależnej od niej fosforylacji białka Bad. Wszelkie analizy prowadzono po iniekcji dootrzewnowej MPTP, którą podawano w schemacie toksyczności ostrej (w sumarycznej dawce 40 mg/kg mc w 3 iniekcjach). FTY720 i PPX podawano w dawce 1 mg/kg mc 1 godz. po ostatniej iniekcji MPTP oraz przez 10 kolejnych dni. Stwierdzono neuroprotektynne właściwości FTY720 w modelu ChP, których miarą był wzrost poziomu immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH-IR) w prążkowiu myszy. Zmiana ta była porównywalna z efektem uzyskanym po podaniu PPX, który również przeciwdziałał obniżeniu aktywności i ekspresji Sphk1 w toksyczności MPTP. Uzyskane wyniki wykazały obniżenie poziomu mRNA i immunoreaktywności Sphk1, a także aktywności tego enzymu w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Wyniki *in vivo* potwierdzają zmiany ekspresji i aktywności Sphk1 i kinazy Akt stwierdzone w modelu komórkowym toksyczności MPP+. W mechanizmie działania obydwu substancji farmakologicznych stwierdzono udział pro-życiowej kinazy Akt. Zarówno FTY720, jak i PPX powodują wzrost poziomu fosforylacji/aktywności tej kinazy w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Zaobserwowano również zwiększony poziom fosforylacji białka Bad, zależny od aktywności kinazy Akt. W wyniku tej modyfikacji Bad może ulegać sekwestracji w cytozolu, co hamuje jego pro-apoptotyczne działanie. Stwierdzono również obniżenie poziomu ekspresji pro-apoptotycznego białka Bax w śródmózgowiu myszy po podaniu PPX w modelu toksyczności MPTP. Analiza behawioralna wykazała, że podanie FTY720 oraz PPX w porównywalnym stopniu znamienne wpływa na poprawę wymuszonej aktywności motorycznej myszy, mierzonej testem Rotarod, w stosowanym modelu ChP. Podsumowując, prezentowane w niniejszej pracy badania po raz pierwszy wykazały obniżenie poziomu ekspresji/aktywności Sphk1 w komórkowym i zwierzęcym modelu ChP. Obniżona synteza S1P stanowić może istotny czynnik w patomechanizmie śmierci

komórek nerwowych w przebiegu ChP. Uzyskane wyniki wskazują na neuroprotekcijną rolę stymulacji receptorów S1P przez specyficznych agonistów (S1P, SEW2871 - agonistę receptora S1PR1) oraz przez FTY720-P, analog S1P i modulator wszystkich receptorów dla S1P z wyjątkiem S1PR2. W zwierzęcym modelu ChP FTY720 wykazuje neuroprotekcynny efekt porównywalny z PPX zarówno na poziomie molekularnym, jak i w ocenie aktywności lokomotorycznej. Ponadto, w mechanizmie działania neuroprotekcynnego PPX stwierdzono jego wpływ na przemiany metaboliczne bioaktywnych sfingolipidów. Uzyskane wyniki wskazują na celowość dalszych poszukiwań nowych neuroprotektantów działających na procesy przekazywania informacji, zależnej od receptorów S1P celem doskonalenia strategii terapeutycznych ChP.

Summary

Parkinson's disease (PD) is the most common serious movement neurodegenerative disorder in the world with highly growing prevalence. PD is characterized by selective loss of neurons in the substantia nigra, which cause is enigmatic in most individuals. Current pharmacotherapy and surgery has beneficial but limited effectiveness because of progressive degradation of neuronal cells. It is urgent to identify promising targets and develop effective drugs. Therefore, searching for a new mechanisms leading to the death of dopaminergic neurons and at the same time trying to find a new disease-modifying pharmacological target is an important task for molecular research. In the last decade it was observed enormous progress in understating the role of sphingolipids in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis (MS), hypoxia/ischemia, traumatic brain injury or Alzheimer's disease (AD). Recent studies indicate the involvement of changes in bioactive sphingolipids homeostasis. In this process, a key role play sphingosine kinases (Sphk1/2, EC: 2.7.1.91), which are conserved lipid enzymes conducting the phosphorylation of sphingosine to sphingosine-1-phosphate (S1P). This bioactive sphingolipid is implicated in almost all fates of mammalian biology, including neurogenesis, angiogenesis, proliferation, migration and regulation of cell survival and death. There are two isoforms of Sphks: Sphk1 and Sphk2. The intracellular pool of S1P is synthesized predominantly by Sphk2, which is mainly located in the cell nucleus and in the mitochondria. Apart from well-established intracellular action, this bioactive molecule can be transported out of the cell and exert mitogenic and anti-apoptotic effect in the autocrine and paracrine manner as a ligand of five S1P-specific G protein coupled cell surface receptors. This pool of S1P is synthesized predominantly by Sphk1. Sphk1 and Sphk2 are essential enzymes in the regulation of S1P level, hence the level of its precursor - ceramide, which play an opposite role within a cell. Whereas S1P has been associated with cell growth and survival, ceramide has been shown to be important in growth arrest and apoptosis. The equilibrium between the above sphingolipids, also called 'sphingolipid rheostat' is regulated by Sphk1 and Sphk2, making them a key controller of cell fate and attractive targets in the development of therapeutic strategy. Sphingolipid rheostat concept has important clinical implications. There is substantial evidence to support a role of S1P reduced level connected with an increase of ceramide concentration in *post mortem* brains

of AD patients. On the other hand, Fingolimod (FTY720) - sphingosine analog and agonist of all S1P receptors without S1PR2 is the first oral drug approved by the FDA for MS. However, until now the role of S1P disturbances in PD remains unknown.

The main goal of our study was to examine the expression and activity of Sphk1 and its role in the mechanism of neuronal cell death in cellular and animal PD model. Moreover, we studied the potential neuroprotective properties of the S1P receptors agonists and modulator (FTY720) at the molecular level and estimated animals motor activity in *in vitro/in vivo* model of PD.

Our study was divided into two parts: conducted in sequence *in vitro* and *in vivo* model of PD. We used neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) and its precursor able to cross the blood-brain barrier: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), which were subjected to human *neuroblastoma* cell line (SH-SY5Y) and adult C57BL/6 mice respectively. The aim of *in vitro* study was to determine the expression and activity of Sphk1 and the role of this enzyme in oxidative stress, evoked by MPP+ in SH-SY5Y cells. Moreover, the neuroprotective effect of S1P and its analogs in oxidative stress conditions was evaluated. Current data showed for the first time that exposure to MPP+ (3 mM) leads to a time dependent decrease in the expression, protein level and activity of an Sphk1 enzyme, which suggest crucial role of Sphk1 in alteration of cell viability in MPP+-induced stress conditions. We indicated that pharmacological inhibition of Sphk1, by using compound SKI II (5 μ M), leads to free radicals (FR) generation, reduction of cell viability and apoptotic death. SKI II similarly to MPP+ increased expression of two pro-apoptotic Bcl-2 proteins Bax and BH3-only protein Hrk and decreased a cytochrome c level in a mitochondrial fraction, leading to caspase-dependent poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) proteolysis.

Moreover inhibition of Sphk1 induced presynaptic terminals protein, alpha-synuclein (ASN) release into extracellular compartment. On the other hand, exogenously added ASN reduced Sphk1 activity and close the vicious circle of events, that leads to neuronal cell death. Our results indicate that reduction of Sphk1 gene expression/activity and thus the synthesis of S1P could be a key event in the mechanism of cell death induced by MPP+. Exogenous S1P (1 μ M) in MPP+ induced oxidative stress attenuated FR generation and increased survival of neuronal cells. S1P significantly reduced the expression of pro-apoptotic proteins Bax and Hrk as well as the number of apoptotic cells. The possible receptor mediated mechanism was evaluated by using specific agonists

and antagonists of S1PR1, S1PR2 and S1PR3 receptors. Our study demonstrated that neuroprotective effect of S1P is S1PR1 receptor-mediated. Additionally the viability of SH-SY5Y cells was elevated by S1P analog -P-FTY720, which, besides having well established anti-inflammatory properties, also has a neuroprotective effect.

In the next step the most important results obtained in *in vitro* study were verified in mice PD model, induced by MPTP. This neurotoxin was administered in acute toxicity protocol (in 3 intraperitoneal (i.p.) injections in total dose of 40 mg/kg bw). Our results showed decrease in mRNA level and immunoreactivity of Sphk1 as well as the activity of this enzyme in the mouse midbrain. The results confirm main changes identified in MPP+ cellular toxicity. Moreover the effect of S1P receptors modulator– FTY720 on molecular changes in two parts of mouse brain (striatum and midbrain) and locomotor activity was investigated. The effect of FTY720 was compared with pramipexole (PPX), dopamine D2/D3 receptors agonist. Mice had received i.p. injection of FTY720 or PPX (1mg/kg bw) in sequence during 10 days. Parkinsonian mice exhibited significant loss of dopaminergic nerve terminals within striatum, evaluated as reduced immunoreactivity level of tyrosine hydroxylase (TH-IR). Our data for the first time indicated that FTY720 in comparable level to PPX significantly up-regulated TH-IR in MPTP mice striatum. These changes were accompanied by activation of Sphk1 activity and expression, as well as activation of another pro-survival Akt kinase phosphorylation/activity. Both compounds increased significantly phospho-Akt immunoreactivity level in MPTP-treated mice midbrain. Subsequently, FTY720 abolished the reduction of BAD protein phosphorylation in MPTP mice midbrain, which should protect cells against BAD-mediated mitochondrial disturbances and cell death. Finally, the significant changes in forced motor activity measured by Rotarod test were found. Total time spent on the accelerating rod in third day of experiment was increased almost two-fold after FTY720 administration, which gives an effect similar to PPX.

Presented in following dissertation data suggest that Sphk1 alterations and reduced S1P synthesis can be a significant factor in the pathogenesis of neuronal cell death in the course of PD and other neurodegenerative diseases. Moreover, present study indicated the new neuroprotective mechanism of PPX action connected with sphingolipid signalling activation. Our results support a protective role of S1P receptor stimulation directly by exogenous S1P and S1PR1 agonist (SEW2871) in *in vitro* study and sphingosine analog and S1PR modulator - FTY720 in *in vivo* PD model. Indicated

neuroprotective mechanisms and importance of S1P receptors stimulation should be considered in view of its potent actions in therapeutic strategy of PD.

Literatura

Abramova NA, Cassarino DS, Khan SM, Painter TW, Bennett JP. Inhibition by R(+) or S(-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma. *J Neurosci Res* 2002; 67: 494–500.

Adamczyk A, Czapski GA, Kaźmierczak A, Strosznajder JB. Effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists on alpha-synuclein-evoked neuronal nitric oxide synthase activation in the rat brain. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 1078–85.

Adamczyk A, Kacprzak M, Kaźmierczak A. Alpha-synuclein decreases arachidonic acid incorporation into rat striatal synaptoneurosomes. *Folia Neuropathol* 2007; 45: 230–5.

Adamczyk A, Kaźmierczak A, Czapski GA, Strosznajder JB. Alpha-Synuclein induced cell death in mouse hippocampal (HT22) cells is mediated by nitric oxide-dependent activation of caspase-3. *FEBS Lett* 2010; 584: 3504–8.

Adamczyk A, Kaźmierczak A, Strosznajder JB. Alpha-Synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. Relationship to nitric oxide. *Neurochem Int* 2006; 49: 407–12.

Adamczyk A, Strosznajder JB. Alpha-synuclein potentiates Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Neuroreport* 2006; 17: 1883–6.

Adams-Carr KL, Bestwick JP, Shribman S, Lees A, Schrag A, Noyce AJ. Constipation preceding Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016; 87: 710–6.

Adem A, Mattsson ME, Nordberg A, Pählman S. Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Brain Res*. 1987; 430:235–42.

Ader I, Brizuela L, Bouquerel P, Malavaud B, Cuvillier O. Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1alpha during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 8635–42.

Akahoshi N, Ishizaki Y, Yasuda H, Murashima YL, Shinba T, Goto K, i wsp.. Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate receptor 2. *Epilepsy Behav*. 2011; 22: 659–65.

Alam Q, Alam MZ, Mushtaq G, Damanhoury GA, Rasool M, Kamal MA, Haque A. Inflammatory Process in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Central Role of Cytokines. *Curr Pharm Des*. 2016; 22:541–8.

Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, Van Echten-Deckert G, i wsp. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem* 2004; 279: 52487–92.

Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, i wsp. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 2010; 465: 1084–8.

Anastasiadou S, Knöll B. The multiple sclerosis drug fingolimod (FTY720) stimulates neuronal gene expression, axonal growth and regeneration. *Exp Neurol* 2016; 279: 243–60.

- Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae SS, i wsp. Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem* 2002; 277: 6667–75.
- Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004; 10 Suppl: S18–25.
- Andreassen OA, Ferrante RJ, Dedeoglu A, Albers DW, Klivenyi P, Carlson EJ, i wsp. Mice with a partial deficiency of manganese superoxide dismutase show increased vulnerability to the mitochondrial toxins malonate, 3-nitropropionic acid, and MPTP. *Exp Neurol* 2001; 167: 189–95.
- Argraves KM, Argraves WS. HDL serves as a S1P signaling platform mediating a multitude of cardiovascular effects. *J Lipid Res* 2007; 48: 2325–33.
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20: 394-401.
- Asle-Rousta M, Kolahdooz Z, Oryan S, Ahmadiani A, Dargahi L. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (A β 42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *J Mol Neurosci.* 2013;50: 524-32.
- Baker DL, Pham TCT, Sparks MA. Structure and catalytic function of sphingosine kinases: Analysis by site-directed mutagenesis and enzyme kinetics. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831:139-46.
- Ballard PA, Tetrud JW, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* 1985; 35:949–56.
- Bandhuvula P, Tam YY, Oskouian B, Saba JD. The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 33697–700.
- Bao Y, Li K, Guo Y, Wang Q, Li Z, Yang Y, i wsp. Tumor suppressor PRSS8 targets signaling in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016; 7 :26780-92.
- Bassetti CL, Bornatico F, Fuhr P, Schwander J, Kallweit U, Mathis J, i wsp. Pramipexole versus dual release levodopa in restless legs syndrome: a double blind, randomised, cross-over trial. *Swiss Med Wkly.* 2011; 141:w13274.
- Baudhuin LM, Jiang Y, Zaslavsky A, Ishii I, Chun J, Xu Y. S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). *FASEB J* 2004; 18: 341–3.
- Beach TG, Adler CH, Dugger BN, Serrano G, Hidalgo J, Henry-Watson J, i wsp. Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72: 130–6.
- Beavan M, McNeill A, Proukakis C, Hughes D a, Mehta A, Schapira AH V. Evolution of Prodromal Clinical Markers of Parkinson Disease in a GBA Mutation-Positive Cohort. *JAMA Neurol* 2015; 72: 201–8.
- Beckham TH, Cheng JC, Lu P, Shao Y, Troyer D, Lance R, i wsp. Acid ceramidase induces sphingosine kinase 1/S1P receptor 2-mediated activation of oncogenic Akt signaling. *Oncogenesis* 2013; 2: e49.
- Bennett J, Burns J, Welch P, Bothwell R. Safety and Tolerability of R(+) Pramipexole in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2015; 49: 1179–87.

- Berdyshev E V., Gorshkova I, Skobeleva A, Bittman R, Lu X, Dudek SM, i wsp. FTY720 inhibits ceramide synthases and up-regulates dihydrosphingosine 1-phosphate formation in human lung endothelial cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 5467–77.
- Berghauzen-Maciejewska K, Wardas J, Kosmowska B, Domin H, Śmiałowska M, Głowacka U, Ossowska K. Adaptive down-regulation of the serotonin transporter in the 6-hydroxydopamine-induced rat model of preclinical stages of Parkinson's disease and after chronic pramipexole treatment. *Neuroscience*. 2016 ;314: 22-34.
- Berghauzen-Maciejewska K, Wardas J, Kosmowska B, Głowacka U, Kuter K, Ossowska K. Alterations of BDNF and trkB mRNA expression in the 6-hydroxydopamine-induced model of preclinical stages of Parkinson's disease: an influence of chronic pramipexole in rats. *PLoS One* 2015; 10: e0117698.
- Bertrand E, Lechowicz W, Szpak GM, Dymecki J. Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol*. 1997;35:80-6.
- Bezard E, Gross CE, Fournier M-C, Dovero S, Bloch B, Jaber M. Absence of MPTP-Induced Neuronal Death in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *Exp Neurol* 1999; 155: 268–73.
- Bhaskara VK, Challa S, Panigrahi M, Babu PP. Differential PARP cleavage: an indication for existence of multiple forms of cell death in human gliomas. *Neurol India* 2009; 57: 264–8.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973; 33: 2643–52.
- Billich A, Bornancin F, Dévay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, Baumruker T. Phosphorylation of the Immunomodulatory Drug FTY720 by Sphingosine Kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 47408–15.
- Bisaglia M, Mammi S, Bubacco L. Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: analysis of the interactions with alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2007; 282: 15597–605.
- Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res* 2014; 55: 1596–608.
- Blanc CA, Rosen H, Lane TE. FTY720 (fingolimod) modulates the severity of viral-induced encephalomyelitis and demyelination. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 138.
- Blesa J, Pifl C, Sanchez-Gonzalez MA, Juri C, Garcia-Cabezas MA, Adanez R, i wsp. The nigrostriatal system in the presymptomatic and symptomatic stages in the MPTP monkey model: A PET, histological and biochemical study. *Neurobiol Dis* 2012; 48: 79–91.
- Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* 2014; 8: 155.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 2015; 9: 91.
- Bogucki A. Apomorphine in advanced Parkinson disease. *Neurol Neurochir Pol*. 2013; 47: 476-83.

- Bohnen NI, Albin RL, Müller ML, Petrou M, Kotagal V, Koeppe RA, i wsp. Frequency of cholinergic and caudate nucleus dopaminergic deficits across the predemented cognitive spectrum of Parkinson disease and evidence of interaction effects. *JAMA Neurol.* 2015; 72: 194-200.
- Bonhoure E, Lauret A, Barnes DJ, Martin C, Malavaud B, Kohama T, i wsp. Sphingosine kinase-1 is a downstream regulator of imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2008; 22: 971-9.
- Bouquerel P, Gstalder C, Müller D, Laurent J, Brizuela L, Sabbadini RA, i wsp. Essential role for SphK1/S1P signaling to regulate hypoxia-inducible factor 2 α expression and activity in cancer. *Oncogenesis* 2016; 5: e209.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197-211.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 2004; 318: 121-34.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 2010; 123: 3209-14.
- Breckenridge CB, Berry C, Chang ET, Sielken RL Jr, Mandel JS. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016; 11:e0151841.
- Breckenridge CB, Sturgess NC, Butt M, Wolf JC, Zadory D, Beck M, i wsp. Pharmacokinetic, neurochemical, stereological and neuropathological studies on the potential effects of paraquat in the substantia nigra pars compacta and striatum of male C57BL/6J mice. *Neurotoxicology.* 2013; 37: 1-14.
- Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, i wsp. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 883-97.
- Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: Sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am J Transplant.* 2004; 4: 1019-25.
- Brunkhorst R, Vutukuri R, Pfeilschifter W. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 283.
- Buehrer BM, Bardes ES, Bell RM. Protein kinase C-dependent regulation of human erythroleukemia (HEL) cell sphingosine kinase activity. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* 1996; 1303: 233-42.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 4546-50.

Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, i wsp. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* 2002; 22: 8797–807.

Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: A large caspase-activating complex. *Biochimie*. 2002; 84: 203-14.

Camprubi-Robles M, Mair N, Andratsch M, Benetti C, Beroukas D, Rukwied R, i wsp. Sphingosine-1-phosphate-induced nociceptor excitation and ongoing pain behavior in mice and humans is largely mediated by S1P3 receptor. *J Neurosci* 2013; 33: 2582–92.

Cassarino DS, Fall CP, Smith TS, Bennett JP. Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. *J Neurochem* 1998; 71: 295–301.

Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, Smith TS, Halvorsen EM, Miller SW, i wsp. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1362: 77-86.

Cassarino DS, Parks JK, Parker WD, Bennett JP. The parkinsonian neurotoxin MPP+ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1453: 49-62.

Ceccom J, Loukh N, Lauwers-Cances V, Touriol C, Nicaise Y, Gentil C, i wsp. Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 12.

Chagniel L, Robitaille C, Lacharité-mueller C, Bureau G, Cyr M. Partial dopamine depletion in MPTP-treated mice differentially altered motor skill learning and action control. *Behav Brain Res*. 2012; 228: 9-15.

Chaitanya G, Alexander JS, Babu P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 2010; 8: 31.

Chaitanya GV, Babu PP. Activation of calpain, cathepsin-b and caspase-3 during transient focal cerebral ischemia in rat model. *Neurochem Res* 2008; 33: 2178–86.

Chaitanya GV, Babu PP. Differential PARP cleavage: An indication of heterogeneous forms of cell death and involvement of multiple proteases in the infarct of focal cerebral ischemia in rat. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29: 563–73.

Chalimoniuk M, Langfort J. The effect of subchronic, intermittent L-DOPA treatment on neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase expression and activity in the striatum and midbrain of normal and MPTP-treated mice. *Neurochem Int*. 2007; 50: 821-33.

Chalimoniuk M, Lukacova N, Marsala J, Langfort J. Alterations of the expression and activity of midbrain nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. *Neuroscience*. 2006; 141: 1033-46.

Chalimoniuk M, Stolecka A, Ziemińska E, Stepień A, Langfort J, Strosznajder JB. Involvement of multiple protein kinases in cPLA2 phosphorylation, arachidonic acid

release, and cell death in in vivo and in vitro models of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced parkinsonism--the possible key role of PKG. *J Neurochem.* 2009; 110: 307-17.

Chau KY, Cooper JM, Schapira AH V. Pramipexole reduces phosphorylation of alpha-synuclein at serine-129. *J Mol Neurosci* 2013; 51: 573–80.

Chaudhuri AD, Choi DC, Kabaria S, Tran A, Junn E. MicroRNA-7 Regulates the Function of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Targeting VDAC1 Expression. *J Biol Chem.* 2016; 291: 6483-93.

Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 464-74.

Chen CX, Huang SY, Zhang L, Liu YJ. Synaptophysin enhances the neuroprotection of VMAT2 in MPP+-induced toxicity in MN9D cells. *Neurobiol Dis.* 2005; 19: 419-26.

Chen S, Lee JM, Zeng C, Chen H, Hsu CY, Xu J. Amyloid beta peptide increases DP5 expression via activation of neutral sphingomyelinase and JNK in oligodendrocytes. *J Neurochem* 2006; 97: 631–40.

Cheng L, Chen Y zheng, Peng Y, Yi N, Gu X shi, Jin Y, i wsp. Ceramide production mediates cinobufotalin-induced growth inhibition and apoptosis in cultured hepatocellular carcinoma cells. *Tumor Biol* 2015; 36: 5763–71.

Cheshire P, Ayton S, Bertram KL, Ling H, Li A, McLean C, Halliday GM, O'Sullivan SS, Revesz T, Finkelstein DI, Storey E, Williams DR. Serotonergic markers in Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias. *Mov Disord.* 2015; 30: 796-804.

Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 2009; 30: 127–35.

Chia LG, Ni DR, Cheng FC, Ho YP, Kuo JS. Intrastratial injection of 5,7-dihydroxytryptamine decreased 5-HT levels in the striatum and suppressed locomotor activity in C57BL/6 mice. *Neurochem Res* 1999; 24: 719–22.

Chia LG, Ni DR, Cheng LJ, Kuo JS, Cheng FC, Dryhurst G. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 5,7-dihydroxytryptamine on the locomotor activity and striatal amines in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett* 1996; 218: 67–71.

Chiba Y, Takeuchi H, Sakai H, Misawa M. SKI II, an inhibitor of sphingosine kinase, ameliorates antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness, but not airway inflammation, in mice. *J Pharmacol Sci* 2010; 114: 304–10.

Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* 2010; 37: 299-310.

Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rivera R, Lee CW, Noguchi K, i wsp. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 751–6.

Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevvana M, i wsp. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 9613–8.

Chun J, Hartung H-P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clinical neuropharmacology.* 2011. p. 91–101.

- Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: Expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res* 1989; 49: 219–25.
- Cieślik M, Czapski GA, Strosznajder JB. The molecular mechanism of amyloid β 42 peptide toxicity: The role of sphingosine kinase-1 and mitochondrial sirtuins. *PLoS One*. 2015; 10:e0137193.
- Colombini M. Ceramide channels and mitochondrial outer membrane permeability. *J Bioenerg Biomembr*. 2016 [Epub ahead of print]
- Couttas TA, Kain N, Daniels B, Lim XY, Shepherd C, Kril J, Pickford R, Li H, Garner B, Don AS. Loss of the neuroprotective factor Sphingosine 1-phosphate early in Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2: 9.
- Cuvillier O, Levade T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* 2001; 98: 2828–36.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind JS, i wsp. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 1996; 381: 800–3.
- Czapski GA, Gąssowska M, Wilkaniec A, Cieślik M, Adamczyk A. Extracellular alpha-synuclein induces calpain-dependent overactivation of cyclin-dependent kinase 5 in vitro. *FEBS Lett* 2013; 587: 3135–41.
- Czapski GA, Strosznajder JB. Białka a stres oksydacyjny. Mózg a stres, Wydawnictwo Platan, Kraków 2008.
- Czech B, Pfeilschifter W, Mazaheri-Omrani N, Strobel MA, Kahles T, Neumann-Haefelin T, i wsp. The immunomodulatory sphingosine 1-phosphate analog FTY720 reduces lesion size and improves neurological outcome in a mouse model of cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389: 251–6.
- Czubowicz K, Cieślik M, Pyszko J, Strosznajder JB, Strosznajder RP. Sphingosine-1-phosphate and its effect on glucose deprivation/glucose reload stress: from gene expression to neuronal survival. *Mol Neurobiol* 2015; 51: 1300–8.
- Czubowicz K, Strosznajder R. Ceramide in the Molecular Mechanisms of Neuronal Cell Death. The Role of Sphingosine-1-Phosphate. *Mol Neurobiol*. 2014; 50:26-37.
- D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 2001; 114: 3771–8.
- Dąbrowska M, Schinwelski M, Sitek EJ, Muraszko-Klaudiel A, Brockhuis B, Jamrozik Z, Sławek J. The role of neuroimaging in the diagnosis of the atypical parkinsonian syndromes in clinical practice. *Neurol Neurochir Pol*. 2015; 49: 421-31.
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 2003; 39: 889–909.
- de Bie RM, Gladstone RM, Strafella AP, Ko JH, Lang AE. Manganese-induced Parkinsonism associated with methcathinone (Ephedrone) abuse. *Arch Neurol*. 2007 ;64:886-9.

- Deogracias R, Yazdani M, Dekkers MPJ, Guy J, Ionescu MCS, Vogt KE, i wsp. Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 14230–5.
- Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2013; 62: 132-44.
- Ding G, Sonoda H, Yu H, Kajimoto T, Goparaju SK, Jahangeer S, i wsp. Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. *J Biol Chem* 2007; 282: 27493–502.
- Ding X, Chaiteerakij R, Moser CD, Shaleh H, Boakye J, Chen G, i wsp. Antitumor effect of the novel sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 is enhanced by inhibition of autophagy and by sorafenib in human cholangiocarcinoma cells. *Oncotarget*. 2016; 7: 20080-92.
- Dipasquale B, Marini AM, Youle RJ. Apoptosis and DNA degradation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1442–8.
- Doi Y, Takeuchi H, Horiuchi H, Hanyu T, Kawanokuchi J, Jin S, i wsp. Fingolimod Phosphate Attenuates Oligomeric Amyloid β -Induced Neurotoxicity via Increased Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Neurons. *PLoS One* 2013; 8: 1–10.
- Don AS, Martinez-Lamenca C, Webb WR, Proia RL, Roberts E, Rosen H. Essential requirement for sphingosine kinase 2 in a sphingolipid apoptosis pathway activated by FTY720 analogues. *J Biol Chem* 2007; 282: 15833–42.
- Donadio V, Incensi A, Leta V, Giannoccaro MP, Scaglione C, Martinelli P, i wsp. Skin nerve α -synuclein deposits: a biomarker for idiopathic Parkinson disease. *Neurology* 2014; 82: 1362–9.
- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, i wsp. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 2007; 68: 384-6.
- Downward J, Basu S. YAP and p73: a complex affair. *Mol Cell*. 2008; 32: 749-50.
- Du F, Li R, Huang Y, Li X, Le W. Dopamine D3 receptor-preferring agonists induce neurotrophic effects on mesencephalic dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 2422–30.
- Du YS, Dodel RC, Bales KR, Jemmerson R, HamiltonByrd E, Paul SM. Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 1997; 69: 1382–8.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, i wsp. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997; 275: 661-5.
- Dunning CJ, Reyes JF, Steiner JA, Brundin P. Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? *Prog Neurobiol*. 2012; 97: 205-19.
- Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 2008; 415: 333–44.

- Edsall LC, Cuvillier O, Twitty S, Spiegel S, Milstien S. Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J Neurochem* 2001; 76: 1573–84.
- Edsall LC, Pirianov GG, Spiegel S. Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J Neurosci* 1997; 17: 6952–60.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, i wsp. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J.* 2003; 17:1945-7.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.
- Fan L, Jiang L, Du Z. Myeloid cell leukemia 1 (Mcl(-1)) protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) induced apoptosis in Parkinson's disease. *Metab Brain Dis* 2015; 30: 1269–74.
- Fenoy AJ, Simpson RK Jr. Risks of common complications in deep brain stimulation surgery: management and avoidance. *J Neurosurg.* 2014; 120:132-9.
- Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K, Oertel WH. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 65: 425–31.
- Ferrari-Toninelli G, Maccarinelli G, Uberti D, Buerger E, Memo M. Mitochondria-targeted antioxidant effects of S(-) and R(+) pramipexole. *BMC Pharmacol* 2010; 10: 2.
- Fiszler U, Bogucki A. Choroby układu pozapiramidowego. *Neurologia. Podręcznik dla studentów medycyny*.tom II pod redakcją W. Kozubskiego i PA. Liberskiego, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2014
- Forloni G, Artuso V, La Vitola P, Balducci C. Oligomeropathies and pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's diseases. *Mov Disord.* 2016; 31:771-81.
- Forno LS. Neuropathology of Parkinson's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 259–72.
- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, i wsp. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995; 81: 727–36.
- Fredriksson A, Archer T. MPTP-induced behavioural and biochemical deficits: A parametric analysis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1994; 7: 123-32.
- Fredriksson A, Palomo T, Chase T, Archer T. Tolerance to a suprathreshold dose of L-Dopa in MPTP mice: Effects of glutamate antagonists. *J Neural Transm* 1999; 106: 283–300.
- French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, Yun JK, Smith CD. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* 2003; 63: 5962-9.
- French KJ, Upson JJ, Keller SN, Zhuang Y, Yun JK, Smith CD. Antitumor Activity of Sphingosine Kinase Inhibitors. *Pharmacology* 2006; 318: 596–603.

- Friedman A. Mechanizmy neurodegeneracji w chorobie Parkinsona. Choroba Parkinsona - mechanizmy, rozpoznawanie, leczenie pod redakcją A. Friedmana. Wydawnictwo Czelej; Warszawa 2005, wyd.1
- Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, i wsp. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 1416–26.
- Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med.* 2014; 16:217-30.
- Gao P, Peterson YK, Smith RA, Smith CD. Characterization of isoenzyme-selective inhibitors of human sphingosine kinases. *PLoS One.* 2012; 7: e44543.
- Gąssowska M, Cieslik M, Wilkaniec A, Strosznajder JB. Sphingosine kinases/sphingosine-1-phosphate and death Signalling in APP-transfected cells. *Neurochem Res.* 2014; 39:645-52.
- Ghosh AP, Cape JD, Klocke BJ, Roth KA. Deficiency of pro-apoptotic Hrk attenuates programmed cell death in the developing murine nervous system but does not affect Bcl-x deficiency-induced neuron apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 976–83.
- Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 2010; 33:317-25.
- Gomez-Brouchet A, Pchejetski D, Brizuela L, Garcia V, Altié M-F, Maddelein M-L, i wsp. Critical role for sphingosine kinase-1 in regulating survival of neuroblastoma cells exposed to amyloid-beta peptide. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 341–9.
- Goparaju SK, Jolly PS, Watterson KR, Bektas M, Alvarez S, Sarkar S, i wsp. The S1P2 receptor negatively regulates platelet-derived growth factor-induced motility and proliferation. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4237–49.
- Gräler MH, Bernhardt G, Lipp M. EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* 1998; 53: 164–9.
- Gräler MH, Grosse R, Kusch A, Kremmer E, Gudermann T, Lipp M. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *J Cell Biochem* 2003; 89: 507–19.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281:1309-12.
- Grünblatt E, Mandel S, Berkuzki T, Youdim MB. Apomorphine protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Mov Disord.* 1999; 14:612-8.
- Gu M, Irvani M, Cooper JM, King D, Jenner P, Schapira AH. Pramipexole protects against apoptotic cell death by non-dopaminergic mechanisms. *J Neurochem* 2004; 91: 1075–81.
- Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, Luo C, Marmorstein R, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science.* 2009; 325: 1254-7.
- Hait NC, Sarkar S, Le Stunff H, Mikami A, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 2005; 280: 29462-9.

- Hait NC, Wise LE, Allegood JC, O'Brien M, Avni D, Reeves TM, i wsp. Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat Neurosci.* 2014; 17: 971-80.
- Hallman H, Lange J, Olson L, Strömberg I, Jonsson G. Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurones in the mouse. *J Neurochem* 1985; 44: 117–27.
- Ham J, Towers E, Gilley J, Terzano S, Randall R. BH3-only proteins: key regulators of neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1015–20.
- Hang L, Basil AH, Lim KL. Nutraceuticals in Parkinson's Disease. *Neuromolecular Med.* 2016; 18: 306-21.
- Harada J, Foley M, Moskowitz MA, Waeber C. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *J Neurochem* 2004; 88: 1026–39.
- Hare DJ, Adlard PA, Doble PA, Finkelstein DI. Metallobiology of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Metallomics* 2013; 5: 91–109.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, i wsp. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 2875–80.
- Hartmann A, Michel PP, Troadec JD, Mouatt-Prigent A, Faucheux BA, Ruberg M, i wsp. Is bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J Neurochem* 2001; 76: 1785–93.
- Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, Rolland W, Zhang JH. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats. *Stroke* 2010; 41: 368–74.
- Hassouna I, Wickert H, Zimmermann M, Gillardon F. Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neurosci Lett* 1996; 204: 85–8.
- Hattoria N, Wanga M, Taka H, Fujimura T, Yoritaka A, Kubo S, i wsp. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15 Suppl 1:S35-8.
- He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 398–408.
- Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol* 2008; 4: 600–9.
- Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology.* 2016; 46: 292-300.
- Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Mouse SPNS2 Functions as a Sphingosine-1-Phosphate Transporter in Vascular Endothelial Cells. *PLoS One.* 2012; 7: e38941.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology.* 1967; 17:427-42.

- Huang K, Huang J, Chen C, Hao J, Wang S, Huang J, i wsp. AP-1 regulates sphingosine kinase 1 expression in a positive feedback manner in glomerular mesangial cells exposed to high glucose. *Cell Signal* 2014; 26: 629–38.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ, Hughes DL. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg, Psychiatry* 1992; 55: 181–4.
- Huwiler A, Kotelevets N, Xin C, Pastukhov O, Pfeilschifter J, Zangemeister-Wittke U. Loss of sphingosine kinase-1 in carcinoma cells increases formation of reactive oxygen species and sensitivity to doxorubicin-induced DNA damage. *Br J Pharmacol* 2011; 162: 532–43.
- Imamura K, Takeshima T, Nakaso K, Ito S, Nakashima K. Pramipexole has astrocyte-mediated neuroprotective effects against lactacystin toxicity. *Neurosci Lett* 2008; 440: 97–102.
- Imeri F, Fallegger D, Zivkovic A, Schwalm S, Enzmann G, Blankenbach K, i wsp. Novel oxazolo-oxazole derivatives of FTY720 reduce endothelial cell permeability, immune cell chemotaxis and symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neuropharmacology* 2014; 85: 314–27.
- Itano Y, Nomura Y. 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP+) causes DNA fragmentation and increases the Bcl-2 expression in human neuroblastoma, SH-SY5Y cells, through different mechanisms. *Brain Res* 1995; 704: 240–5.
- Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18: S183–5.
- Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* 2007; 2: 141–51.
- Jang A, Lee HJ, Suk JE, Jung JW, Kim KP, Lee SJ. Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J Neurochem* 2010; 113: 1263–74.
- Jarman KE, Moretti P a B, Zebol JR, Pitson SM. Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1. *J Biol Chem* 2010; 285: 483–92.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 2173–7.
- Jellinger KA. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol.* 1991;14:153-97.
- Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, Obeid LM. Role of Human Sphingosine-1-phosphate Phosphatase 1 in the Regulation of Intra- and Extracellular Sphingosine-1-phosphate Levels and Cell Viability. *J Biol Chem* 2003; 278: 34541–7.
- Johnson RG. Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 1988; 68: 232–307.

Jonnalagadda D, Sunkara M, Morris AJ, Whiteheart SW. Granule-mediated release of sphingosine-1-phosphate by activated platelets. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1841: 1581-9.

Joyce JN, Presgraves S, Renish L, Borwege S, Osredkar T, Hagner D, i wsp. Neuroprotective effects of the novel D3/D2 receptor agonist and antiparkinson agent, S32504, in vitro against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and in vivo against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): A comparison to ropinirole. *Exp Neurol* 2003; 184: 393-407.

Joyce JN, Woolsey C, Ryoo H, Borwege S, Hagner D. Low dose pramipexole is neuroprotective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease, and downregulates the dopamine transporter via the D3 receptor. *BMC Biol* 2004; 2: 22.

Kalra J, Rajput AH, Mantha SV, Prasad K. Serum antioxidant enzyme activity in Parkinson's disease. *Mol Cell Biochem* 1992; 110: 165-8.

Kano O, Ikeda K, Kiyozuka T, Iwamoto K, Ito H, Kawase Y, i wsp. Beneficial effect of pramipexole for motor function and depression in Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008; 4: 707-10.

Kanthasamy AG, Anantharam V, Zhang D, Latchoumycandane C, Jin H, Kaul S, i wsp. A novel peptide inhibitor targeted to caspase-3 cleavage site of a proapoptotic kinase protein kinase C delta (PKCdelta) protects against dopaminergic neuronal degeneration in Parkinson's disease models. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 1578-89.

Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, i wsp. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010; 362: 387-401.

Katsel P, Li C, Haroutunian V. Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: A shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res* 2007; 32: 845-56.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53: 3976-85.

Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 1387-401.

Kaźmierczak A, Strosznajder JB, Adamczyk A. α -Synuclein enhances secretion and toxicity of amyloid beta peptides in PC12 cells. *Neurochem Int* 2008; 53: 263-9.

Kharel Y, Lee S, Snyder AH, Sheasley-O'Neill SL, Morris MA, Setiady Y, i wsp. Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J Biol Chem* 2005; 280: 36865-72.

Khwanraj K, Phruksaniyom C, Madlah S, Dharmasaroja P. Differential Expression of Tyrosine Hydroxylase Protein and Apoptosis-Related Genes in Differentiated and Undifferentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Treated with MPP(.). *Neurol Res Int*. 2015;2015:734703.

- Kieburz K, Wunderle KB. Parkinson's disease: Evidence for environmental risk factors. *Mov Disord*. 2013; 28: 8-13.
- Kihara Y, Maceyka M, Spiegel S, Chun J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br J Pharmacol*. 2014; 171: 3575-94.
- Kim HJ, Miron VE, Dukala D, Proia RL, Ludwin SK, Traka M, i wsp. Neurobiological effects of sphingosine 1-phosphate receptor modulation in the cuprizone model. *FASEB J* 2011; 25: 1509–18.
- Kimura A, Ohmori T, Kashiwakura Y, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, i wsp. Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain infarction. *Stroke* 2008; 39: 3411–7.
- Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, i wsp. Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells* 2007; 25: 115–24.
- Kimura K, Bowen C, Spiegel S, Gelmann EP. Tumor necrosis factor-alpha sensitizes prostate cancer cells to gamma-irradiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59: 1606–14.
- Kish SJ, Morito C, Hornykiewicz O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett* 1985; 58: 343–6.
- Kishimoto T, Ishitsuka R, Kobayashi T. Detectors for evaluating the cellular landscape of sphingomyelin- and cholesterol-rich membrane domains. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2016;
- Kitamura Y, Kohno Y, Nakazawa M, Nomura Y. Inhibitory effects of talipexole and pramipexole on MPTP-induced dopamine reduction in the striatum of C57BL/6N mice. *Jpn J Pharmacol*. 1997; 74:51-7.
- Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, Kohno Y, Nomura Y, i wsp. Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 1046–54.
- Kitao Y, Matsuyama T, Takano K, Tabata Y, Yoshimoto T, Momoi T, i wsp. Does ORP150/HSP12A protect dopaminergic neurons against MPTP/MPP(+)-induced neurotoxicity? *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 589–95.
- Klaidman LK, Adams JD, Leung AC, Sam Kim S, Cadenas E. Redox cycling of MPP+: Evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 169–79.
- Kleuser B, Cuvillier O, Spiegel S. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell death in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. *Cancer Res* 1998; 58: 1817–24.
- Klivenyi P, St Clair D, Wermer M, Yen HC, Oberley T, Yang L, i wsp. Manganese superoxide dismutase overexpression attenuates MPTP toxicity. *Neurobiol Dis* 1998; 5: 253–8.

- Kluk MJ, Hla T. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002. p. 72–80.
- Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 23722–8.
- Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu YP, i wsp. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem* 2004; 279: 29367–73.
- Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer* 2013; 4: 342–59.
- Kozak-Putowska D, Iżęcka J, Piskorz J, Wójcik G, Nalepa D. Kinezyterapia w chorobie Parkinsona. *Med Ogólna i Nauk o Zdrowiu* 2015; 21: 19–23.
- Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Molecular Cell*. 2010. p. 8–24.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979–80.
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 1999; 46: 598–605.
- Langston JW. The Parkinson's complex: Parkinsonism is just the tip of the Iceberg. *Ann Neurol* 2006; 59: 591–6.
- Laskowska I. Rola jąder podstawy w regulacji funkcji poznawczych. *Neuropsychiatr i Neuropsychol* 2009; 4: 26–35.
- Lau A, Arundine M, Sun H-S, Jones M, Tymianski M. Inhibition of caspase-mediated apoptosis by peroxynitrite in traumatic brain injury. *J Neurosci* 2006; 26: 11540–53.
- Lauterbach EC, Victoroff J, Coburn KL, Shillcutt SD, Doonan SM, Mendez MF. Psychopharmacological neuroprotection in neurodegenerative disease: assessing the preclinical data. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2010; 22: 8–18.
- Le Stunff H, Giussani P, Maceyka M, Lépine S, Milstien S, Spiegel S. Recycling of sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 and sphingosine kinase 2. *J Biol Chem* 2007; 282: 34372–80.
- Lebouvier T, Neunlist M, des Varannes SB, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, i wsp. Colonic biopsies to assess the neuropathology of parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 2010; 5: 1–9.
- Leclercq TM, Pitson SM. Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB Life* 2006; 58: 467–72.
- Lee DH (a), Kim CS, Lee YJ. Astaxanthin protects against MPTP/MPP+-induced mitochondrial dysfunction and ROS production in vivo and in vitro. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 271–80.
- Lee HJ (b), Baek SM, Ho DH, Suk JE, Cho ED, Lee SJ. Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Exp Mol Med* 2011; 43: 216–22.

- Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular Localization and Exocytosis of α -Synuclein and its Aggregates. *J Neurosci* 2005; 25: 6016–24.
- Lee KD, Chow WN, Sato-Bigbee C, Graf MR, Graham RS, Colello RJ, i wsp. FTY720 reduces inflammation and promotes functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2009; 26: 2335–44.
- Lewy FH. Paralysis agitans. Pathologische anatomie. Lewandowsky M, editor. *Handbuch der Neurologie*, Volume 3. Berlin :Springer, 1912 ; 920-933
- Li C, Guo Y, Xie W, Li X, Janokovic J, Le W. Neuroprotection of pramipexole in UPS impairment induced animal model of Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2010; 35: 1546–56.
- Li J, Song Z, Wang Y, Yin Y, Liu Y, Yuan R, i wsp. Overexpression of SphK1 enhances cell proliferation and invasion in triple-negative breast cancer via the PI3K/AKT signaling pathway. *Tumour Biol*. 2016; 37: 10587-93.
- Li P, Wu J, Zheng J, Pei D. A Sphingosine Kinase-1 Inhibitor, SKI II, Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15: 10381-5.
- Liebermann A. Depression in Parkinson's disease -- a review. *Acta Neurol Scand* 2006; 113: 1-8.
- Lim KG, Tonelli F, Berdyshev E, Gorshkova I, Leclercq T, Pitson SM, i wsp. Inhibition kinetics and regulation of sphingosine kinase 1 expression in prostate cancer cells: Functional differences between sphingosine kinase 1a and 1b. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 1457–64.
- Limaye V, Li X, Hahn C, Xia P, Berndt MC, Vadas MA, Gamble JR. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood* 2005; 105: 3169–77.
- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, i wsp. Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2004; 24: 9993–10002.
- Litvan I, Bhatia KP, Burn DJ, Goetz CG, Lang AE, McKeith I, Quinn N, Sethi KD, Shults C, Wenning GK; Movement Disorders Society Scientific Issues Committee. Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov Disord*. 2003; 18: 467-86.
- Litvan I, Goldman JG, Tröster AI, Schmand BA, Weintraub D, Petersen RC, i wsp. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord* 2012; 27: 349–56.
- Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, i wsp. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 2000; 275: 19513–20.
- Liu K, Xu H, Xiang H, Sun P, Xie J. Protective effects of Ndfip1 on MPP⁺-induced apoptosis in MES23.5 cells and its underlying mechanisms. *Exp Neurol* 2015; 273: 215–24.

- Lohr KM, Chen M, Hoffman CA, McDaniel MJ, Stout KA, Dunn AR, i wsp. Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2) Level Regulates MPTP Vulnerability and Clearance of Excess Dopamine in Mouse Striatal Terminals. *Toxicol Sci.* 2016; 153: 79-88.
- Loveridge C, Tonelli F, Leclercq T, Lim KG, Long JS, Berdyshev E, i wsp. The sphingosine kinase 1 inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl)thiazole induces proteasomal degradation of sphingosine kinase 1 in mammalian cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 38841-52.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, RR. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Shooting the messenger: Oxidative stress regulates sphingosine-1-phosphate. *Circ Res* 2007; 100: 7-9.
- Machwate M, Rodan SB, Rodan GA, Harada SI. Sphingosine kinase mediates cyclic AMP suppression of apoptosis in rat periosteal cells. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 70-7.
- MacLennan AJ, Benner SJ, Andringa A, Chaves AH, Rosing JL, Vesey R, i wsp. The S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor is essential for auditory and vestibular function. *Hear Res* 2006; 220: 38-48.
- Magdalinou N, Lees AJ, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid biomarkers in parkinsonian conditions: an update and future directions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014; 85: 1065-75.
- Mair N, Benetti C, Andratsch M, Leitner MG, Constantin CE i wsp. Genetic evidence for involvement of neuronally expressed S1P₁ receptor in nociceptor sensitization and inflammatory pain. *PLoS One.* 2011; 6: e17268.
- Marek Ł. The role of the apoptosome in the activation of procaspase-9. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 54-64.
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 1984; 311: 464-7.
- Marttila RJ, Lorentz H, Rinne UK. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J Neurol Sci* 1988; 86: 321-31.
- Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME, Fu H. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 1325-31.
- Mastrandrea LD, Sessanna SM, Laychock SG. Sphingosine kinase activity and sphingosine-1 phosphate production in rat pancreatic islets and INS-1 cells: Response to Cytokines. *Diabetes* 2005; 54: 1429-36.
- Mayol K, Biajoux V, Marvel J, Balabanian K, Walzer T. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood* 2011; 118: 4863-71.
- Means CK, Xiao CY, Li Z, Zhang T, Omens JH, Ishii I, i wsp. Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: H2944-51.
- Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal.* 2013; 11: 34.

- Melendez AJ, Carlos-Dias E, Gosink M, Allen JM, Takacs L. Human sphingosine kinase: Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* 2000; 251: 19–26.
- Merlo S, Canonico PL, Sortino MA. Distinct effects of pramipexole on the proliferation of adult mouse sub-ventricular zone-derived cells and the appearance of a neuronal phenotype. *Neuropharmacology* 2011; 60: 892–900.
- Meyer Heringdorf D. Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signalling by G-protein-coupled receptors. *EMBO J* 1998; 17: 2830–7.
- Mitra N, Mohanakumar KP, Ganguly DK. Dissociation of serotonergic and dopaminergic components in acute effects of 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Brain Res Bull* 1992; 28: 355–64.
- Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development. *J Biol Chem* 2005; 280: 11113–21.
- Moon MH, Jeong JK, Lee YJ, Park SY. FTY720 protects neuronal cells from damage induced by human prion protein by inactivating the JNK pathway. *Int J Mol Med* 2013; 32: 1387–93.
- Moratalla R, Quinn B, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM. Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3859–63.
- Moriue T, Igarashi J, Yoneda K, Nakai K, Kosaka H, Kubota Y. Sphingosine 1-phosphate attenuates H₂O₂-induced apoptosis in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 852–7.
- Muralikrishnan D, Mohanakumar KP. Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice. *FASEB J* 1998; 12: 905–12.
- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 3214–20.
- Mutschler E. Zespół Parkinsona i leki przeciwparkinsonowskie. *Farmakologia i toksykologia Mutschlera III wyd.* Wrocław 2012
- Nagiec MM, Skrzypek M, Nagiec EE, Lester RL, Dickson RC. The LCB4 (YOR171c) and LCB5 (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J Biol Chem* 1998; 273: 19437–42.
- Nakahara T, Iwase A, Nakamura T, Kondo M, Bayasula, Kobayashi H, i wsp. Sphingosine-1-phosphate inhibits H₂O₂-induced granulosa cell apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway. *Fertil Steril*. 2012; 98:1001-8.e1.
- Neubauer HA, Pitson SM. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *FEBS J* 2013; 280: 5317–36.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci*. 1985; 36: 2503-8.

- Nishiuma T, Nishimura Y, Okada T, Kuramoto E, Kotani Y, Jahangeer S, i wsp. Inhalation of sphingosine kinase inhibitor attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294: L1085-93.
- Nitkowska M, Czyżyk M, Friedman A. Reproductive life characteristics in females affected with parkinson's disease and in healthy control subjects – a comparative study on polish population. *Neurol Neurochir Pol*. 2014; 48: 322-7.
- Noda H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. *J Neuroimmunol* 2013; 256: 13–8.
- Norimatsu Y, Ohmori T, Kimura A, Madoiwa S, Mimuro J, Seichi A, i wsp. FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol*. 2012; 180: 1625-35.
- Norris EH, Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM. Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications. *J Biol Chem* 2003; 278: 27230–40.
- Noyce AJ, Lees AJ, Schrag A-E. The prediagnostic phase of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016; 87: 871-8.
- Obata T, Yamanaka Y. Parkinsonism induced by MPTP and free radical generation. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2001; 117: 105-10.
- Ogawa C, Kihara A, Gokoh M, Igarashi Y. Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *J Biol Chem* 2003; 278: 1268–72.
- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 604–16.
- Ohno Y, Shimizu S, Tokudome K, Kunisawa N, Sasa M. New insight into the therapeutic role of the serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2015; 134:104-21.
- Olanow CW, Brundin P. Parkinson's Disease and Alpha Synuclein: Is Parkinson's Disease a Prion-Like Disorder? *Mov Disord*. 2013; 28: 31-40.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS. Lewy-body formation is an aggregates-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol*. 2004;3:496-503.
- Olivera A, Allende ML, Proia RL. Shaping the landscape: Metabolic regulation of S1P gradients. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1831:193-202.
- Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 1993; 365: 557–60.
- Oyarce AM, Fleming PJ. Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 1991; 290: 503–10.
- Pacheco J, Ramírez-Jarquín JO, Vaca L. Microdomains Associated to Lipid Rafts. *Adv Exp Med Biol* 2016; 898: 353–78.
- Påhlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 1984; 14: 135–44.

- Pain S, Gochard A, Bodard S, Gulhan Z, Prunier-Aesch C, Chalon S. Toxicity of MPTP on neurotransmission in three mouse models of Parkinson's disease. *Exp Toxicol Pathol*. 2013; 65: 689-94.
- Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, i wsp. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. 2007; 316: 295-8.
- Park G, Jeong JW, Kim JE. SIRT1 deficiency attenuates MPP⁺-induced apoptosis in dopaminergic cells. *FEBS Lett*. 2011; 585: 219-24.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; 14: 223–36; discussion 222.
- Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett* 2003; 554: 189–93.
- Pchejetski D, Kunduzova O, Dayon A, Calise D, Seguelas MH, Leducq N, i wsp. Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ Res* 2007; 100: 41–9.
- Pellegrino S, Altmeyer M. Interplay between Ubiquitin, SUMO, and Poly(ADP-Ribose) in the Cellular Response to Genotoxic Stress. *Front Genet* 2016; 7: 63.
- Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BH. Pycnogenol protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis. *Mol Brain Res* 2002; 104: 55–65.
- Perez RG, Hastings TG. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem*. 2004; 89: 1318-24.
- Pfeilschifter W, Czech-Zechmeister B, Sujak M, Mirceska A, Koch A, Rami A, i wsp. Activation of sphingosine kinase 2 is an endogenous protective mechanism in cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 413: 212-7.
- Pham TH, Baluk P, Xu Y, Grigorova I, Bankovich AJ, Pappu R, i wsp. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med* 2010; 207: 17–27.
- Pitson SM, Moretti PA, Zebol JR, Zareie R, Derian CK, Darrow AL, i wsp. The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1. *Biochemistry* 2002; 277: 49545–53.
- Pitson SM. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J*. 2003; 22: 5491-500.
- Pitson SM. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends Biochem Sci*. 2011; 36: 97-107.
- Platt FM. Sphingolipid lysosomal storage disorders. *Nature* 2014; 510: 68–75.
- Ponsen MM, Stoffers D, Booij J, van Eck-Smit BL, Wolters ECh, Berendse HW. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2004; 56: 173-81.
- Porras G, Li Q, Bezard E. Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2:a009308.
- Potì F, Ceglarek U, Burkhardt R, Simoni M, Nofer JR. SKI II – a sphingosine kinase 1 inhibitor – exacerbates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient

(LDL-R^{-/-}) mice on high cholesterol diet. *Atherosclerosis* Elsevier Ltd; 2015; 240: 212–5.

Presgraves SP, Borwege S, Millan MJ, Joyce JN. Involvement of dopamine D₂/D₃ receptors and BDNF in the neuroprotective effects of S32504 and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium in terminally differentiated SH-SY5Y cells. *Exp Neurol* 2004; 190: 157–70.

Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest* 2015; 125: 1379–87.

Pyne NJ, Ohotski J, Bittman R, Pyne S. The role of sphingosine 1-phosphate in inflammation and cancer. *Adv Biol Regul* 2014; 54: 121–9.

Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 489–503.

Pyne S, Adams DR, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: Recent advances. *Prog Lipid Res.* 2016; 62: 93-106.

Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1582:121-31.

Pyszko J, Strosznajder JB (a). Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate in Oxidative Stress Evoked by 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP⁺) in Human Dopaminergic Neuronal Cells. *Mol Neurobiol* 2014; 50: 38–48.

Pyszko J, Strosznajder JB (b). The key role of sphingosine kinases in the molecular mechanism of neuronal cell survival and death in an experimental model of Parkinson's disease. *Folia Neuropathol* 2014; 3: 260–9.

Pyszko J, Strosznajder JB. (c) P.5.c.002 The role of sphingosine kinase-1 in alpha-synuclein secretion and neuronal cell death mechanism in an experimental model of Parkinson's disease. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014; 24: S642.

Pytka K, Zygmunt M, Filipek B. Pharmacotherapy of Parkinson's disease: progress or regress? *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 700–8.

Radue EW, O'Connor P, Polman CH, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, i wsp. Impact of fingolimod therapy on magnetic resonance imaging outcomes in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2012; 69:1259-69.

Ramirez AD, Wong SK, Menniti FS. Pramipexole inhibits MPTP toxicity in mice by dopamine D₃ receptor dependent and independent mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2003; 475: 29–35.

Ramsay RR, Youngster SK, Nicklas WJ, McKeown KA, Jin YZ, Heikkila RE, i wsp. Structural dependence of the inhibition of mitochondrial respiration and of NADH oxidase by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) analogs and their energized accumulation by mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 9168–72.

Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 1302-19.

Rektorová I, Rektor I, Bares M, Dostál V, Ehler E, Fanfrdlová Z, i wsp. Cognitive performance in people with Parkinson's disease and mild or moderate depression: effects of dopamine agonists in an add-on to L-dopa therapy. *Eur J Neurol.* 2005; 12: 9-15.

- Ren S, Xin C, Pfeilschifter J, Huwiler A. A novel mode of action of the putative sphingosine kinase inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazole (SKI II): Induction of lysosomal sphingosine kinase 1 degradation. *Cell Physiol Biochem* 2010; 26: 97–104.
- Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 753–63.
- Rotstein NP, Miranda GE, Abrahan CE, German OL. Regulating survival and development in the retina: key roles for simple sphingolipids. *J Lipid Res* 2010; 51: 1247–62.
- Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 302: 348-55.
- Rubio-Osornio M, Gorostieta-Salas E, Montes S, Pérez-Severiano F, Rubio C, Gómez C, i wsp. Epicatechin Reduces Striatal MPP + -Induced Damage in Rats through Slight Increases in SOD-Cu , Zn Activity. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015:276039.
- Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: From familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci*. 2015; 40: 200-10.
- Saggu H, Cooksey J, Dexter D, Wells FR, Lees A, Jenner P, i wsp. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J Neurochem* 1989; 53: 692–7.
- Sałata D, Budkowska M, Dołęgowska B. Sphingosine-1-phosphate--molecular maestro. *Postepy Biochem*. 2012; 58: 281-91.
- Sanchez T, Estrada-Hernandez T, Paik JH, Wu MT, Venkataraman K, Brinkmann V, i wsp. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem* 2003; 278: 47281–90.
- Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem*. 2004; 92: 913-22.
- Sanford M. Fingolimod: a review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Drugs*. 2014; 74:1411-33.
- Santos WL, Lynch KR. Drugging sphingosine kinases. *ACS Chem Biol*. 2015; 10: 225-33.
- Sanz C, Benito A, Inohara N, Ekhterae D, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Specific and rapid induction of the proapoptotic protein Hrk after growth factor withdrawal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 2742–7.
- Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem*. 2000; 74:1-20.
- Sato K, Yamashita T, Hatanaka N, Takemoto M, Hishikawa N, Ohta Y, Abe K. Different clinical features in siblings with identical mutations of the Parkin gene (PARK2). *J Neurol Sci*. 2016; 368: 147-9.
- Satoi H, Tomimoto H, Ohtani R, Kitano T, Kondo T, Watanabe M, i wsp. Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: A role during neuronal apoptosis. *Neuroscience*. 2005; 130: 657-66.

- Sauer B, Gonska H, Manggau M, Kim DS, Schraut C, Schäfer-Korting M, i wsp. Sphingosine 1-phosphate is involved in cytoprotective actions of calcitriol in human fibroblasts and enhances the intracellular Bcl-2/Bax rheostat. *Pharmazie* 2005; 60: 298–304.
- Schrag A, Horsfall L, Walters K, Noyce A, Petersen I. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: A case-control study. *Lancet Neurol* 2015; 14: 57–64.
- Schulze H, Sandhoff K. Sphingolipids and lysosomal pathologies. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1841: 799-810.
- Schulze T, Golfier S, Tabeling C, Rabel K, Graler MH, Witzenrath M, i wsp. Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *FASEB J* 2011; 25: 4024–36.
- Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 2005; 309: 1735–9.
- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, i wsp. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2002; 2: 55–67.
- Sedelis M, Schwarting RKW, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2001; 125: 109–25.
- Seki N, Maeda Y, Kataoka H, Sugahara K, Chiba K. Role of Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Receptor 1 in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Pharmacol Pharm* 2013; 4: 628–37.
- Seniuk NA, Tatton WG, Greenwood CE. Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res* 1990; 527: 7–20.
- Serdar M, Herz J, Kempe K, Lumpe K, Reinboth BS, Sizonenko SV, i wsp. Fingolimod protects against neonatal white matter damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia. *Brain Behav Immun* 2016; 52: 106–19.
- Shin JY, Park HJ, Ahn YH, Lee PH. Neuroprotective effect of l-dopa on dopaminergic neurons is comparable to pramipexol in MPTP-treated animal model of Parkinson's disease: A direct comparison study. *J Neurochem* 2009; 111: 1042–50.
- Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985; 311: 617–31.
- Singleton PA, Chatchavalvanich S, Fu P, Xing J, Birukova AA, Fortune JA, Klivanov AM, i wsp. Akt-mediated transactivation of the s1p1 receptor in caveolin-enriched microdomains regulates endothelial barrier enhancement by oxidized phospholipids. *Circ Res* 2009; 104: 978–86.
- Sivasubramanian M, Kanagaraj N, Dheen ST, Tay SSW. Sphingosine kinase 2 and sphingosine-1-phosphate promotes mitochondrial function in dopaminergic neurons of mouse model of Parkinson's disease and in MPP+ -treated MN9D cells in vitro. *Neurosci* 2015; 290: 636–48.
- Sławek J. Kryteria rozpoznawania, różnicowanie, obraz kliniczny zaburzeń ruchowych oraz powikłania ruchowe późnego okresu choroby. *Choroba Parkinsona i inne zaburzenia*

- ruchowe Tom 1 pod redakcją J. Sławka, A. Friedmana, A. Boguckiego, G. Opali. Wydawnictwo Via Medica, Gdańsk 2011, wyd.1.
- Sławek J. Zespół i choroba Parkinsona. Neurologia tom II pod redakcją A. Stępnia, Wydawnictwo Medical Tribune Polska, Warszawa 2014
- Slowik A, Schmidt T, Beyer C, Amor S, Clarner T, Kipp M. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 is neuroprotective after cuprizone-induced CNS demyelination. *Br J Pharmacol* 2014; 172: 80–92.
- Snow BJ, Vingerhoets FJ, Langston JW, Tetrud JW, Sossi V, Calne DB. Pattern of dopaminergic loss in the striatum of humans with MPTP induced parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68: 313–6.
- Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 397–407.
- Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 403–15.
- Spillantini MG, Goedert M. The alpha-Synucleinopathies: Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy. *Ann New York Acad Sci* 2000; 920: 16–27.
- Spohr TC, Dezone RS, Nones J, Dos Santos Souza C, Einicker-Lamas M, Gomes FC, Rehen SK. Sphingosine 1-phosphate-primed astrocytes enhance differentiation of neuronal progenitor cells. *J Neurosci Res* 2012; 90: 1892–902.
- Stephenson DT, Childs MA, Li Q, Carvajal-Gonzalez S, Opsahl A, Tengowski M, i wsp. Differential loss of presynaptic dopaminergic markers in Parkinsonian monkeys. *Cell Transplant*. 2007; 16: 229-44.
- Stiban J, Tidhar R, Futerman AH. Ceramide synthases: Roles in cell physiology and signaling. *Adv Exp Med Biol* 2010; 688: 60–71.
- Stocchi F, Stirpe P. The relevance of dopaminergic level in nocturnal disability in Parkinson's disease: Implications of continuous dopaminergic stimulation at night to treat the symptoms. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014; 121 Suppl 1: S79-83.
- Strub GM, Paillard M, Liang J, Gomez L, Allegood JC, Hait NC, i wsp. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB J*. 2011; 25: 600–12.
- Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto H, Sakurada S, Takuwa Y. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1534–45.
- Svensson E, Henderson VW, Borghammer P, Horváth-Puhó E, Sørensen HT. Constipation and risk of Parkinson's disease: A Danish population-based cohort study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016; 28: 18-22.
- Sykes DA, Riddy DM, Stamp C, Bradley ME, McGuinness N, Sattikar A, i wsp. Investigating the molecular mechanisms through which FTY720-P causes persistent S1P1 receptor internalization. *Br J Pharmacol* 2014; 171: 4797–807.

- Tadano T, Satoh N, Sakuma I, Matsumura T, Kisara K, Arai Y, i wsp. Behavioral and biochemical changes following acute administration of MPTP and MPP+. *Life Sci* 1987; 40: 1309–18.
- Taha TA, Argraves KM, Obeid LM. Sphingosine-1-phosphate receptors: Receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1682: 48-55.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 181–95.
- Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, i wsp. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 9938–43.
- Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M. Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm* 1994; 98: 107–18.
- Takasugi N, Sasaki T, Ebinuma I, Osawa S, Isshiki H, Takeo K, Tomita T, Iwatsubo T. FTY720/fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- β production in neurons. *PLoS One*. 2013; 8: e64050.
- Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, i wsp. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci* 2011; 31: 6850–7.
- Tieu K, Zuo DM, Yu PH. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of Bcl-2 and p53 proteins. *J Neurosci Res* 1999; 58: 426–35.
- Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, i wsp. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 1995; 373: 335–9.
- Trinh J, Farrer M. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 445–54.
- Venderova K, Park DS. Programmed cell death in Parkinson’s disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2. pii: a009365.
- Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, i wsp. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res* 2008; 102: 669–76.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, i wsp. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2837–42.
- Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805–16.
- Walker CL, Liu NK, Xu XM. PTEN/PI3K and MAPK signaling in protection and pathology following CNS injuries. *Front Biol (Beijing)*. 2013; 8.
- Walsh DM, Selkoe DJ. A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2016; 17: 251-60.

Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci*. 2004; 24: 10963-10973.

Wang P, Li J, Qiu S, Wen H, Du J. Hormone replacement therapy and Parkinson's disease risk in women: a meta-analysis of 14 observational studies. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014; 11: 59-66.

Wang S, Song T, Leng C, Lan K, Ning J, Chu H. Propofol protects against the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Mol Med Rep*. 2016; 13: 309-14.

Watson C, Long JS, Orange C, Tannahill CL, Mallon E, McGlynn LM, *et al*. High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Am J Pathol*. 2010; 177: 2205-15.

Watson DG, Tonelli F, Alossaimi M, Williamson L, Chan E, Gorshkova I, *et al*. The roles of sphingosine kinases 1 and 2 in regulating the Warburg effect in prostate cancer cells. *Cell Signal* 2013; 25: 1011-7.

Wilkaniec A, Strosznajder JB, Adamczyk A. Toxicity of extracellularly secreted alpha-synuclein: Its role in nitrosative stress and neurodegeneration. *Neurochem Int*. 2013; 62: 776-83.

Wooten GF. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75: 637-9.

Wu F, Poon WS, Lu G, Wang A, Meng H, Feng L, *et al*. Alpha-Synuclein knockdown attenuates MPP⁺ induced mitochondrial dysfunction of SH-SY5Y cells. *Brain Res*. 2009; 1292: 173-9.

Xie H, Hu L, Li G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 1086-92.

Xiong Y, Yang P, Proia RL, Hla T. Erythrocyte-derived sphingosine 1-phosphate is essential for vascular development. *J Clin Invest* 2014; 124: 4823-8.

Xu L, Zhang Y, Zou Y, Wang G, Fu Y. Concurrent targeting Akt and sphingosine kinase 1 by A-674563 in acute myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 472: 662-8.

Yang Y, Wang M, Lv B, Ma R, Hu J, Dun Y, Sun S, Li G. Sphingosine kinase-1 protects differentiated N2a cells against beta-amyloid₂₅₋₃₅-induced neurotoxicity via the mitochondrial pathway. *Neurochem Res* 2014; 39: 932-40.

Yang YL, Ji C, Cheng L, He L, Lu CC, Wang R, *et al*. Sphingosine kinase-1 inhibition sensitizes curcumin-induced growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells. *Cancer Sci*. 2012; 103: 1538-45.

Yazdi A, Baharvand H, Javan M. Enhanced remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice under treatment with fingolimod (FTY720). *Neuroscience*. 2015; 311: 34-44.

Ye X, Han Y, Zhang L, Liu W, Zuo J. MTERF4 regulates the mitochondrial dysfunction induced by MPP⁺ in SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 464: 214-20.

- You LH, Li Z, Duan XL, Zhao BL, Chang YZ, Shi ZH. Mitochondrial Ferritin Suppresses MPTP-induced Cell Damage by Regulating Iron Metabolism and Attenuating Oxidative Stress. *Brain Res.* 2016; 1642: 33-42.
- Young JE, Garden GA, Martinez RA, Tanaka F, Sandoval CM, Smith AC, i wsp. Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk. *J Neurosci.* 2009; 29: 1987-97.
- Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure.* 2013; 21: 501-15.
- Yung LM, Wei Y, Qin T, Wang Y, Smith CD, Waeber C. Sphingosine kinase 2 mediates cerebral preconditioning and protects the mouse brain against ischemic injury. *Stroke* 2012; 43: 199–204.
- Zhang C, He H, Zhang H, Yu D, Zhao W, Chen Y, i wsp. The blockage of Ras/ERK pathway augments the sensitivity of SphK1 inhibitor SKI II in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 434: 35–41.
- Zhang D, Xia H, Zhang W, Fang B. The anti-ovarian cancer activity by WYE-132, a mTORC1/2 dual inhibitor. *Tumour Biol.* 2016; 37: 1327-36.
- Zhang Y, Yu Q, Lai TB, Yang Y, Li G, Sun SG. Effects of small interfering RNA targeting sphingosine kinase-1 gene on the animal model of Alzheimer's disease. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013; 33: 427–32.
- Zhao Q, Ye J, Wei N, Fong C, Dong X. Protection against MPP⁺-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells by tormentic acid via the activation of PI3-K/Akt/GSK3 β pathway. *Neurochem Int.* 2016; 97: 117-23.
- Zheng M, Liu C, Fan Y, Shi D, Zhang Y. Protective Effects of Paeoniflorin Against MPP⁽⁺⁾-induced Neurotoxicity in PC12 Cells. *Neurochem Res.* 2016; 41: 1323-34.
- Zhu L, Ploessl K, Kung HF. PET/SPECT imaging agents for neurodegenerative diseases. *Chem Soc Rev.* 2014;43:6683-91.
- Zhu Z, Zhu Z, Cai H, Liu Y. Reversion of Multidrug Resistance by SKI II in SGC7901 / DDP Cells and Exploration of Underlying Mechanisms. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13: 625–31.
- Zou LL, Xu J, Jankovic J, He Y, Appel SH, Le WD. Pramipexole inhibits lipid peroxidation and reduces injury in the substantia nigra induced by the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett.* 2000; 281: 167–70.