

STRESZCZENIE

Ekspozycja na ksenobiotyki takie jak związki toksyczne, środki farmakologiczne i uzależniające może prowadzić do silnych i trwałych zaburzeń układu nerwowego, zwłaszcza gdy do narażenia dochodzi w okresie prenatalnym lub tuż po urodzeniu. Obecnie postuluje się udział tych związków w etiologii chorób układu nerwowego m.in. chorobie Parkinsona (np. rotenon) czy chorobie Alzheimera (np. pochodna bisfenolu-A tj. TBBPA). Badania epidemiologiczne potwierdziły udział np. ftalanów w rozwoju zaburzeń psychicznych u dzieci, takich jak zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) oraz autyzm. Ze względu na powszechność występowania, dowiedzioną szkodliwość wobec organizmów żywych i niską biodegradowalność w środowisku, do badań w niniejszej pracy wybrano nonylofenol, związek z grupy alkilofenoli. Pomimo dowodów na obecność nonylofenolu w tkankach człowieka, wiedza na temat wpływu nonylofenolu na układ nerwowy ssaków, szczególnie w okresie prenatalnym jest znikoma.

Obecna praca stanowi próbę określenia nieznanych dotąd mechanizmów działania nonylofenolu w komórkach hipokampa myszy, ze szczególnym uwzględnieniem apoptozy i neurotoksyczności, a także receptorów estrogenowych ER α , ER β i wybranych receptorów dla ksenobiotyków RXR, PXR i CAR. Z uwagi na występowanie korelacji między narażeniem na związki endokrynnie czynne a rozwojem chorób układu nerwowego i coraz większe zainteresowanie wpływem tych związków na rozwijający się mózg, wykonano badania mające na celu określić skutki prenatalnej ekspozycji na nonylofenol w odniesieniu do apoptozy i neurotoksyczności, jak również ekspresji mRNA i białka receptorów estrogenowych oraz receptorów dla ksenobiotyków.

Podstawowym modelem badawczym były komórki nerwowe hipokampa myszy w hodowli pierwotnej *in vitro*, które pozyskiwano z płodów kontrolnych względnie z płodów narażonych na działanie nonylofenolu od 5 do 16 dnia rozwoju prenatalnego. Komórki w hodowli pierwotnej były poddawane działaniu nonylofenolu (1, 5 i 10 μ M) lub rozpuszczalnika *in vitro*. Zastosowano następujące układy doświadczalne:

- i. Komórki hipokampa myszy pobrane z płodów kontrolnych, a następnie poddane działaniu nonylofenolu względnie rozpuszczalnika *in vitro*.
- ii. Komórki hipokampa myszy pobrane z płodów narażonych na działanie nonylofenolu, a następnie poddane działaniu rozpuszczalnika *in vitro*.
- iii. Komórki hipokampa myszy pobrane z płodów narażonych na działanie nonylofenolu, a następnie poddane działaniu nonylofenolu, względnie rozpuszczalnika *in vitro*.

Wpływ stopnia rozwoju komórek nerwowych na efekty działania nonylofenolu badano w 2, 7 i 12 DIV (dzień rozwoju *in vitro*). Badano toksyczne efekty działania nonylofenolu i towarzyszące im procesy apoptotyczne. W celu określenia przeżywalności komórek w hodowli, zmierzono poziom uwalniania dehydrogenazy mleczanowej, ilość ATP w metabolicznie aktywnych komórkach oraz wykonano barwienie kalceiną-AM. Procesy apoptotyczne po ekspozycji na nonylofenol określano za pomocą zmian błonowego potencjału mitochondrialnego i aktywności kaspazy-3. W 7 DIV wyznaczono krzywe toksyczności zależne od czasu ekspozycji, który wynosił: 3, 6, 9, 14 i 24 godziny. Morfologiczne zmiany w komórkach obserwowane podczas apoptozy ujawniono wykonując barwienie Hoechst 33342. Udział innych enzymów zaangażowanych w ścieżki apoptozy zweryfikowano stosując specyficzne inhibitory kaspazy-8 i -9 oraz kalpain. Następnie wykonano pomiary ekspresji mRNA i białka receptorów estrogenowych ER α i ER β oraz receptorów dla ksenobiotyków RXR α , PXR i CAR wykorzystując qPCR, testy ELISA i Western blot. Udział wymienionych receptorów w neurotoksycznych i apoptotycznych efektach działania nonylofenu zweryfikowano stosując selektywne ligandy receptorów estrogenowych (DPN, MPP, PPT i PHTPP), selektywnego antagonistę RXR (HX 531), a także specyficzne siRNA wobec *Rxra*, *Pxr* i *Car* oraz par receptorów *Pxr/Rxra* i *Car/Rxra*. Ponadto wykonano serię barwień immunofluorescencyjnych w celu wizualizacji rozmieszczenia i gęstości badanych receptorów w komórkach nerwowych hipokampa.

Pierwszym celem pracy doktorskiej była identyfikacja toksycznych i apoptotycznych efektów działania nonylofenolu w komórkach nerwowych hipokampa myszy z uwzględnieniem stopnia rozwoju w hodowli pierwotnej *in vitro*. Wyznaczono profile aktywności kaspazy-3, uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz zmian błonowego potencjału mitochondrialnego w komórkach narażonych na działanie nonylofenolu w 2, 7 i 12 dniu hodowli *in vitro*, przy czym czas ekspozycji ustalono na 6 godzin. Pozytywną kontrolę potwierdzającą właściwy dobór układu doświadczalnego stanowiły poziomy badanych parametrów w komórkach poddanych działaniu kwasu glutaminowego. W 2 i 7 dniu hodowli *in vitro* komórki hipokampa myszy były podatne na działanie 5 i 10 μ M nonylofenolu, podczas gdy 12-dniowe hodowle odpowiadały tylko na najwyższe stężenie tego związku. Ponadto 2-dniowe hodowle hipokampa nie były wrażliwe na działanie kwasu glutaminowego, co świadczy prawdopodobnie o braku pełnej ekspresji funkcjonalnych receptorów glutaminianergicznych, które jak donoszą dane literaturowe, mają kluczową rolę w zjawisku neurotoksyczności. Z moich badań wynika, że im młodsze są komórki nerwowe w hodowli pierwotnej *in vitro* tym większa jest ich wrażliwość na

apoptotyczne (spadek błonowego potencjału mitochondrialnego, wzrost aktywności kaspazy - 3) i neurotoksyczne (wzrost uwalniania LDH) efekty działania nonylofenolu.

Z uwagi na to, że komórki w 2 DIV nie były wrażliwe na kwas glutaminowy, a komórki w 12 DIV odpowiadały tylko na najwyższe z zastosowanych stężeń nonylofenolu, kolejne etapy badań *in vitro* przeprowadzono na komórkach będących w 7 DIV. Ponadto, oprócz 6-godzinnej narażenia na nonylofenol stosowano 3-, 9-, 14- i 24-godzinnej ekspozycję na ten związek. Komórki nerwowe hipokampa będące w 7 dniu hodowli *in vitro* stanowią model doświadczalny do zbadania mechanizmów działania nonylofenolu. Te komórki zostały pobrane z płodów kontrolnych i stanowią układ odniesienia dla komórek pobranych z płodów narażonych na nonylofenol.

Drugim celem obecnej pracy było zbadanie apoptotycznych i neurotoksycznych mechanizmów działania nonylofenolu. Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, że nonylofenol użyty w stężeniach odpowiadających jego akumulacji w tkankach ludzi i zwierząt indukuje apoptozę i działa toksycznie na komórki nerwowe hipokampa myszy w hodowli pierwotnej *in vitro*. Wskazuje na to spadek błonowego potencjału mitochondrialnego, wzrost aktywności kaspazy-3 i nasilenie apoptotycznej fragmentacji jąder komórkowych, a także wzrost uwalniania dehydrogenazy mleczanowej oraz obniżenie poziomu ATP i żywotności komórek w odpowiedzi na nonylofenol. Użycie specyficznych inhibitorów wykazało udział kaspazy-3, -8 i -9 w efektach działania nonylofenolu, natomiast nie potwierdziło zaangażowania kalpain w obserwowane efekty pro-apoptotyczne. Wyniki te wskazują, że apoptoza indukowana nonylofenolem jest zależna od kaspaz i angażuje zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowy szlak apoptotyczny.

Kolejnymi celami pracy doktorskiej była weryfikacja udziału receptorów estrogenowych ER α i ER β oraz receptorów dla ksenobiotyków RXR α , PXR i CAR w toksycznych i apoptotycznych efektach działania nonylofenolu, a następnie pomiar ekspresji mRNA i białka wybranych receptorów. Na podstawie doświadczeń z użyciem selektywnych ligandów i specyficznych siRNA wykazano, że mechanizm działania nonylofenolu w komórkach nerwowych hipokampa wiąże się z upośledzeniem funkcji receptorów estrogenowych ER α i ER β przy równoczesnej aktywacji receptorów dla ksenobiotyków RXR α , PXR i CAR. Nonylofenol stymulował ekspresję mRNA i białka receptorów dla ksenobiotyków, a równocześnie zaburzał ekspresję receptorów estrogenowych tj. stymulował mRNA *Erb* i obniżał poziom białka ER α , o czym świadczą analizy qPCR, Western blot, ELISA, barwienia immunofluorescencyjne oraz zdjęcia z mikroskopu konfokalnego. Barwienia poszczególnych receptorów wykonane zostały w konfiguracji

z przeciwciałem do białka MAP-2 co dodatkowo potwierdza obecność wymienionych białek w neuronach hipokampa.

Następnym, piątym celem pracy było określenie wpływu prenatalnej ekspozycji na nonylofenol na apoptozę i neurotoksyczność oraz ekspresję receptorów estrogenowych i wybranych receptorów dla ksenobiotyków. Na podstawie badań przeprowadzonych na komórkach hipokampa myszy pobranych z płodów narażonych na działanie nonylofenolu stwierdzono, że prenatalna ekspozycja na nonylofenol hamuje spontaniczną apoptozę w komórkach nerwowych hipokampa myszy, co wykazano porównując błonowy potencjał mitochondrialny, aktywność kaspazy-3 i uwalnianie LDH w komórkach pobranych z płodów narażonych na nonylofenol, z wartościami tych parametrów w komórkach pobranych z płodów kontrolnych. Stosując ten sam układ odniesienia stwierdzono, że prenatalna ekspozycja na nonylofenol stymuluje ekspresję mRNA *Pxr* i białka CAR przy równoczesnym obniżeniu poziomu białka ER α .

Ostatnim z wyznaczonych celów było zbadanie wpływu nonylofenolu *in vitro* na apoptozę i neurotoksyczność oraz ekspresję mRNA i białka wybranych receptorów w komórkach nerwowych hipokampa, które zostały pobrane od zwierząt poddanych prenatalnej ekspozycji na nonylofenol. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że prenatalna ekspozycja na nonylofenol zwiększa wrażliwość komórek nerwowych hipokampa na apoptotyczne (spadek błonowego potencjału mitochondrialnego, wzrost aktywności kaspazy-3) i neurotoksyczne (wzrost uwalniania LDH) działanie nonylofenolu przy kolejnym zetknięciu z tym ksenobiotykiem *in vitro*. W tym celu porównano wartości badanych parametrów w komórkach pobranych z płodów narażonych na nonylofenol i traktowanych nonylofenolem *in vitro*, z wartościami tych parametrów w komórkach pobranych z płodów kontrolnych i traktowanych nonylofenolem *in vitro*. Ponadto wykazano, że w komórkach hipokampa myszy pobranych z płodów narażonych na działanie nonylofenolu, nonylofenol użyty *in vitro* powoduje wzrost poziomu mRNA wszystkich badanych receptorów z wyjątkiem mRNA *Era*. W odniesieniu do mRNA *Erb*, *Rxra*, *Pxr* i *Car* skutki działania nonylofenolu *in vitro* były zbliżone, niezależnie od narażenia na nonylofenol płodów z których pobrano komórki nerwowe do hodowli. Wywołany przez nonylofenol *in vitro* wzrost ekspresji mRNA wybranych receptorów pokrywał się częściowo ze wzrostem ekspresji białek, głównie PXR i CAR.