

**Tytuł pracy doktorskiej: „Ocena neurotoksycznego działania eterów glikolu etylenowego – badania *in vitro* oraz *in vivo*”**

**Autor: Bartosz Pomierny**

**Promotor: Prof. dr hab. Bogusława Budziszewska**

### **Streszczenie**

Etery glikolu etylenowego (EGE) ze względu na korzystne właściwości fizyko-chemiczne są szeroko stosowane jako składniki preparatów gospodarstwa domowego, farb, lakierów, płynów chłodniczych, barwników fotograficznych, opakowań spożywczych, środków czyszczących i produktów medycznych. Obserwacje kliniczne i badania eksperymentalne wykazały, że związki te wywierają działanie hematotoksyczne, gonadotoksyczne oraz immunotoksyczne. Ponieważ narażenie na etery glikolu etylenowego jest duże a dotychczas nie było danych dotyczących ich wpływu na żywotność czy funkcję komórek centralnego systemu nerwowego, dlatego celem niniejszej pracy była ocena, w modelu *in vivo* i *in vitro*, potencjalnego, neurotoksycznego działania tych związków.

W modelu *in vivo* badano wpływ 4-tygodniowego podawania 2-etoksyetanolu (EE), 2-butoksyetanolu (BE) i 2-fenoksyetanolu (PHA) na markery stresu oksydacyjnego i procesu apoptozy w korze czołowej i hipokampie u samców szczura rasy Wistar. Celem określenia przyczyny proapoptotycznych efektów EGE badano także wpływ tych związków na wychwyt i metabolizm glukozy.

Ponieważ obserwowane w tkankach obwodowych toksyczne efekty EGE wywoływane są nie tylko przez związki macierzyste lecz także ich metabolity, dlatego w modelu *in vitro* porównywano cytotoksyczne i proapoptotyczne działanie EGE i ich metabolitów - kwasów alkoksyoctowych, na komórki ludzkiej neuroblastomy (komórki SH-SY5Y). W modelu *in vitro* określano także udział wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu sygnału w mechanizmie toksycznego działania wybranego eteru glikolu etylenowego (PHE) i jego metabolitu.

W modelu zwierzęcym wykazano, że EGE, a w szczególności 2-fenoksyetanol oraz 2-butoksyetanol, zmniejszały całkowitą aktywność antyoksydacyjną oraz nasilały peroksydację lipidów w badanych strukturach mózgu (kora czołowa i hipokamp). Zmniejszona aktywność

antyoksydacyjna kory czołowej wynikała głównie z obniżenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationu. Te same związki które nasilały stres oksydacyjny wykazały także działanie proapoptotyczne. Zarówno w korze czołowej jak i w hipokampie EGE zwiększały ekspresję kaspazy-3 i kaspazy-9 oraz wpływały na białka regulujące apoptozę. Brak zmian w ekspresji kaspazy-8 i zwiększony poziom kaspazy-9 wskazują na aktywację przez EGE mitochondrialnej ścieżki apoptozy. Wykazano również, że badane związki wpływają na wychwyt i metabolizm glukozy w mózgu. 2-fenoksyetanol i 2-butoksyetanol zmniejszają poziom transporterów glukozy (GLUT1 i GLUT4) a 2-fenoksyetanol obniża stężenie glikogenu w korze czołowej. Analiza zmian w ekspresji czy aktywności enzymów metabolizujących glukozę wskazuje, że badane związki nasilają proces glikolizy natomiast hamują wejście pirogronianu do cyklu Krebsa poprzez zmniejszanie poziomu dehydrogenazy pirogronianowej.

W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem komórek SH-SY5Y, określano wpływ EGE oraz ich metabolitów, kwasów alkoksyoctowych, na żywotność komórek (test redukcji MTT), poziom uwalnianego do pożywki LDH (marker nekrozy), aktywność kaspazy-3 oraz potencjał błonowy mitochondriów (markery apoptozy). Wykazano, że silniejsze działanie uszkodzające wykazują związki o właściwościach lipofilowych (2-fenoksyetanol i 2-butoksyetanol) niż związek hydrofilowy (2-etoksyetanol). Podobnie jak w przypadku działania EGE w tkankach obwodowych, również w większości przeprowadzonych testów, kwasy alkoksyoctowe wykazały silniejsze działanie uszkodzające na komórki neuronalne niż związki macierzyste.

W celu określenia wewnątrzkomórkowego mechanizmu toksycznego działania 2-fenoksyetanolu i kwasu 2-fenoksyoctowego, badano wpływ inhibitorów kinaz białkowych na cytotoksyczne i proapoptotyczne efekty tych związków. Do badań wybrano inhibitory kinaz (m.in. GSK-3 $\beta$ , p38-MAPK, JNK-MAPK, PLC) o dobrze udokumentowanym wpływie na mechanizmy neuroprotekcji / neurodegeneracji. Wykazano, że inhibitor GSK-3 $\beta$  (SB216763) silnie osłabia uszkodzające działanie zarówno 2-fenoksyetanolu jak i jego metabolitu, co stwierdzono we wszystkich przeprowadzonych testach (test redukcji MTT, poziom uwalniania LDH, aktywność kaspazy-3). Wykazano także znaczącą rolę innych kinaz (p38-MAPK, JNK-MAPK i PKC) w cytotoksycznych i proapoptotycznych efektach badanych związków, szczególnie w działaniu metabolitu. Wyniki te wskazują, że neurotoksyczne działanie EGE wynika z ich wpływu na wiele wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu sygnału.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki świadczą, że EGE o właściwościach lipofilowych wywierają toksyczne działanie na komórki OUN. Oznaką neurotoksycznego działania tych związków jest obniżanie aktywności antyoksydacyjnej, nasilanie peroksydacji lipidów oraz aktywacja czynników proapoptotycznych. Ponieważ podobne zmiany obserwowane są także w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, dlatego długotrwałe narażenie na te związki może być jedną z przyczyn coraz częstszego występowania tych chorób. Ponadto w chorobach neurodegeneracyjnych proces apoptozy aktywowany może być wiele lat przed pierwszymi istotnymi klinicznymi symptomami choroby, dlatego narażenie na związki z grupy EGE może być trudne do skojarzenia z rozwijającą się później chorobą.