**Streszczenie rozprawy doktorskiej**

**Mechanizm działania triklosanu w neuronach kory mózgowej myszy w hodowlach in vitro.**

**mgr inż. Konrad Szychowski**

*Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii Zwierząt*

*Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie*

Triklosan (TCS) jest powszechnie stosowanym środkiem przeciwbakteryjnym   
i przeciwgrzybiczym. Jest on wykorzystywany jako dodatek do produktów higieny osobistej takich jak: mydła, pasty do zębów, szampony do włosów, a także do wyrobu tekstyliów i jako dodatek do plastiku. Triklosan w łatwy sposób uwalnia się   
z produktów, które go zawierają i wykrywany jest w kurzu w miejscach pracy   
i w gospodarstwach domowych. Związek ten wykazuje właściwości lipofilne umożliwiające mu łatwe pokonywanie barier biologicznych. Dane dotyczące akumulacji TCS w tkankach ludzkich są niespójne. Pierwotnie wykazano, że związek ten jest metabolizowany w wątrobie, a następnie usuwany wraz z moczem. Obecność TCS u człowieka wykazano w tkankach takich jak krew, tkanka tłuszczowa, wątroba oraz mózg. Liczne badania wykazały, że TCS w stężeniach wykrywanych w środowisku zaburza procesy fizjologiczne organizmów wodnych takich jak mięczakiczy ryby. Do tej pory zostało opublikowane tylko kilka prac mówiących   
o proapoptotycznym działaniu TCS w różnych tkankach oraz możliwości interakcji   
z receptorem węglowodorów aromatycznych (AhR). U ludzi TCS może przekraczać barierę krew mózg, jednak nie ma żadnych danych literaturowych dotyczących mechanizmu jego działania w mózgu ssaków.

Celem prowadzonych badań było określenie wpływu TCS na żywotność   
i proces apoptozy w neuronach kory mózgowej myszy w hodowlach *in vitro*. Podjęto również próbę zbadania zaangażowania receptora AhR i receptora kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) w mechanizm działania tego związku oraz określenie udziału TCS w procesie aktywacji enzymów metabolizujących ksenobiotyki (CYP1A1, CYP1B1).

Neurony kory mózgowej myszy izolowane z płodów mysich w 15/16 dniu rozwoju embrionalnego hodowane były w pożywce Neurobasal bez czerwieni fenolowej suplementowanej B27 i L-glutaminą przez 7 dni do momentu wykonania eksperymentu. W pierwszym etapie badań określono cytotoksyczność wzrastających stężeń (1, 10, 50, 100 nM i 1, 10, 50, 100 µM) TCS oraz zdolność tego związku do indukowania procesu apoptozy po 3, 6 i 24 godzinach ekspozycji. W medium doświadczalnym określono poziom uwolnionego dehydrogenazy mleczanowej (LDH), natomiast w komórkach zmierzono aktywność kaspazy-8, kaspazy-9 i kaspazy-3. Zbadano również ekspresję aktywnych form wspomnianych kaspaz oraz receptora Fas na poziomie białka. Wpływ TCS na fragmentację DNA, formowanie ciałek apoptotycznych oraz aktywność esteraz komórkowych po 24 godzinach zbadano   
z wykorzystaniem metody elektroforezy komórkowego DNA oraz barwienia Hoechst 33342 i kalceina AM. W drugim etapie prowadzonych badań określono jaką rolę receptor AhR pełni w mechanizmie działania TCS do czego wykorzystano metodę transfekcji komórek przy użyciu siRNA dla wspomnianego receptora. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystywano również agonistę i antagonistę receptora AhR (β-naftoflawon (βNF) i α-naftoflawon (αNF)). Po wykonaniu procedury transfekcji siRNA komórki poddawano działaniu 1 i 10 µM TCS oraz βNF i αNF przez 24 godziny, a następnie mierzono poziom uwolnionego LDH i aktywność kaspazy-3. Następnie zbadano wpływ wybranego stężenia TCS (10 µM) na ekspresję mRNA i białka receptora AhR oraz enzymów CYP1A1 i CYP1B1. Dodatkowo określono aktywność cytochromu CYP1A1 po 48 godzinach ekspozycji na 10 µM TCS. Ostatnim etapem prowadzonych badań było określenie wpływu 1 i 10 µM TCS na ekscytotoksyczność zależną od receptora NMDA po 3 i 6 godzinach ekspozycji. W doświadczeniach wykorzystywano nieodwracalnego antagonistę receptora NMDA - MK801. Po przeprowadzonych doświadczeniach z użyciem antagonisty w medium hodowlanym zmierzono poziom uwolnionego LDH, a w komórkach ilość powstałych reaktywnych form tlenu (ROS *ang. reactive oxygen species*) oraz aktywność kaspazy-3. Aby sprawdzić wpływ TCS na ekspresję mRNA i białka podjednostek receptora NMDA (GluN1, GluN2A i GluN2B) wykonano analizę RT-PCR oraz Western Blot.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że we wszystkich badanych przedziałach czasowych TCS w dwóch najwyższych µM stężeniach (50 i 100 µM) wywołuje silny wypływ LDH. Ponadto TCS stymulował aktywność kaspazy-8 i kaspazy-3 już po 3 godzinach ekspozycji. Obserwowano również nasilenie aktywności kaspazy-9, jednak tylko w cytotoksycznych stężeniach TCS. Wzrostowi aktywności kaspazy-8 i kaspazy-3 towarzyszył wzrost ekspresji białka aktywnych form wspomnianych enzymów, a także wzrost ekspresji receptora Fas. Wykonana elektroforeza komórkowego DNA i zastosowanie barwnika Hoechst 33342 wykazały, że po 24 godzinach ekspozycji na TCS dochodziło do fragmentacji materiału genetycznego oraz tworzenia ciałek apoptotycznych. Po przeprowadzonej procedurze wyciszania receptora AhR pod wpływem TCS obserwowano zmniejszenie uwalniania LDH oraz spadek aktywności kaspazy-3. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że TCS zmniejsza ekspresję receptora AhR oraz enzymów CYP1A1 i CYP1B1 na poziomie mRNA. Natomiast na poziomie białka TCS silnie stymulował ekspresję receptora AhR i wspomnianych cytochromów. Przeprowadzone doświadczenia wykazały jednak, że TCS mimo wzrostu ekspresji białka CYP1A1 hamował jego aktywność.

Po zablokowaniu receptora NMDA przy pomocy antagonisty MK801 obserwowano brak uwalniania LDH, obniżenie generowanego ROS oraz zmniejszenie aktywności kaspazy-3. Zbadanie ekspresji mRNA podjednostek receptora NMDA wykazało spadek ekspresji podjednostek GluN1 i GluN2A oraz wzrost GluN2B. Na poziomie białka obserwowano obniżenie ekspresji wszystkich podjednostek tego receptora.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że TCS jest zdolny do aktywacji procesu apoptozy w neuronach kory mózgowej myszy *in vitro*, wywołując cytotoksyczny efekt tylko w najwyższych µM stężeniach. Pozostałe stosowane stężenia TCS aktywują zewnątrzpochodną ścieżkę procesu apoptozy zależną od aktywacji receptora Fas i kaspazy-8. Otrzymane wyniki wykazały, że TCS aktywuje kaspazę-3, a także prowadzi do fragmentacji DNA i powstawania ciałek apoptotycznych, które są klasycznymi wskaźnikami zachodzącego procesu apoptozy. Natomiast po dłuższej ekspozycji TCS aktywuje również wewnątrzpochodną ścieżkę procesu apoptozy związaną z kaspazą-9. W przeprowadzonych doświadczeniach TCS wywoływał spadek ekspresji mRNA receptora AhR oraz CYP1A1 i CYP1B1 i jednocześnie nasilał ekspresję białka receptora AhR oraz zależnych od niego cytochromów. Jednak mimo wzrostu ekspresji białka CYP1A1, TCS silnie hamował aktywność wspomnianego cytochromu. Uzyskane wyniki wykazały, że proapototyczne efekty działania TCS w krótkich przedziałach czasowych są efektem zależnej od receptora NMDA ekscytotoksyczności, związanej z generowaniem komórkowego ROS, natomiast w długich przedziałach czasowych są skutkiem aktywacji receptora Fas i/lub AhR.

Przeprowadzone doświadczenia nad wpływem TCS na funkcję neuronów kory mózgowej myszy wykazały wielokierunkowe działanie tego związku i zaangażowanie przynajmniej trzech mechanizmów molekularnych. Jednak pełne zrozumienie mechanizmu działa TCS w układzie nerwowym wymaga dalszych badań.

**Abstract of Doctoral dissertation**

**Impact of triclosan on in vitro cultured mouse neocortical neurons.**

**Konrad Szychowski, MSc**

*Department of Animal Biotechnology, Animal Sciences Faculty, University of Agriculture*

Triclosan (TCS) is a widely used antibacterial and antifungal agent. It is used as an additive for personal care products such as soaps, toothpastes, shampoos and also for the manufacture of textiles and plastics. Triclosan is easily released from products and is detected in the dust in the workplace and home. This compound exhibits a lipophilic properties which allows easily overcome biological barriers. Data on TCS accumulation in human tissues are inconsistent. Originally it has been shown that this compound is metabolized in the liver and then excreted in urine. The presence of TCS in human bodies has been demonstrated in tissues such as blood, adipose tissue, liver and brain. Numerous studies have shown that TCS concentrations detected in the environment interferes with the physiological processes of aquatic organisms such as mussels and fishs. Up to date, only a few papers have been published about proapoptotic activity of TCS in various tissues and the possibility of interaction with the aryl hydrocarbon receptor (AhR). In humans, TCS exceeds the blood-brain barrier but there are no data in the literature on the mechanism of action in the brain of mammals.

The aim of the presented study was to determine the effect of TCS on viability and apoptosis process in mouse cortical neurons in culture in vitro. The involvement of the AhR receptor and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) and activation of xenobiotic metabolizing enzymes (CYP1A1, CYP1B1) in TCS mechanism of action were also investigated.

Mouse neocortical neurons were isolated from mouse fetuses on 15/16 embryonic day and were cultured in Neurobasal phenol red-free medium supplemented with B27 and L-glutamine for 7 days to the date of experiment. In the first stage of the study, the cytotoxicity of increasing concentrations (1, 10, 50, 100 nM, and 1, 10, 50, 100 µM) of TCS and the ability of this compound to induce apoptosis after 3, 6 and 24 hours of exposure were measured. The experimental medium was collected and the level of lactate dehydrogenase (LDH) release and caspase-8, caspase-9 and caspase-3 activity in the cells were determined. Additionally, protein expression level of active forms of these caspases and Fas receptor were measured. After 24 hours of exposure to TCS, DNA fragmentation, apoptotic bodies formation and the esterase activity were examined (by electrophoresis of the cellular DNA, Hoechst 33342 and Calcein AM staining). In the studies, the role of the AhR receptor pathway in the mechanism of action of TCS was determined by siRNA transfection method. The agonist (β-naphthoflavone (βNF) and antagonist (α-naphthoflavone (αNF)) of AhR were used in these experiments. After the transfection procedure, cells were treated with 1 and 10 µM of TCS and βNF and αNF for 24 hours and then the level of released LDH and caspase-3 activity were measured. To study the expression of mRNA and protein of AhR receptor and CYP1A1 and CYP1B1 ensymes, 10 µM of TCS was selected. Further, the cytochrome CYP1A1 activity was determined after 48 hours of exposure to 10 µM of TCS. The final stage of the study was to determine the effect of 1 and 10 µM of TCS on NMDA receptor-dependent excitotoxicity after 3 and 6 hours of exposure. Irreversible antagonist of the NMDA receptor - MK801 was used in the experiments. Afterwards, the level of released LDH, the amount of generated reactive oxygen species (ROS) and caspase-3 activity were measured. To investigate the effect of TCS on mRNA and protein expression of NMDA receptor subunits (GluN1, GluN2A and GluN2B), RT-PCR and Western Blot analysis were performed.

In the conducted experiments only the two highest concentrations (50 and 100 µM) of TCS induced a strong LDH release in all chosen time frames. Furthermore, TCS stimulated caspase-8 and caspase-3 activity starting from three hours of exposure. Caspase-9 activity was also observed, however, only when exposed to the cytotoxic concentrations of TCS. The increase in caspase-8 and caspase-3 was accompanied by increased expression of active protein forms of these enzymes as well as increased expression of Fas receptor. The electrophoresis of cellular DNA and the use of Hoechst 33342 dye performed after 24 hours exposure to the TCS showed the fragmentation of genetic material and apoptotic bodies formation. After AhR receptor silencing procedure, effect of TCS on LDH release and caspase-3 activity was reduced. It was shown in the performed experiments that TCS decreased expression of mRNA of AhR receptor and CYP1A1 and CYP1B1 enzymes. The opposite effect was observed by examining the expression of the protein level, where TCS strongly stimulated the expression of the AhR receptor and cytochromes. It has been shown that despite the increase of the protein expression of CYP1A1 induced by TCS, activity of this enzyme was inhibited. Addition of NMDA antagonist MK801 has not shown changes in the level of LDH release, ROS generation nor the reduction of caspase-3 activity. Investigation of mRNA expression of NMDA receptor subunits showed an decrease in GluN1 and GluN2A subunits and an increase in GluN2B. At the same time, the reduction of protein expression in all subunits was observed.

The presented results showed that TCS was capable of activating apoptosis in mouse neocortical neurons *in vitro*, resulting in cytotoxic effects only in the highest µM concentrations. Other~~s~~ TCS concentrations used in experiments stimulated the extrinstic apoptosis pathway dependent on the activation of the Fas receptor and caspase-8. The presented results showed that TCS activated caspase-3 and leaded to DNA fragmentation and apoptotic bodies formation, which are the classical markers of apoptosis. Moreover, after the long exposure to TCS the intrinsitc apoptosis pathway was also activated with the involvement of the caspase-9.

In the presented experiments TCS caused a decrease in AhR receptor, CYP1A1 and CYP1B1 mRNA expression and at the same time intensified AhR receptor and cytochromes protein expression. However, despite the increase in protein expression of CYP1A1, TCS strongly inhibited the activity of this enzyme. The results showed that in a short time period, the apoptotic effects of TCS are a result of NMDA receptor-dependent excitotoxicity associated with the generation of ROS. After long time periods, apoptotic effects are a result of the activation of Fas and/or the AhR receptor.

The conducted experiments of the effect of TCS on the mouse neocortical neurons showed high versatility of the compound and the involvement of at least three molecular mechanisms. However, the full understanding of the TCS mechanism of action in the nervous system requires further investigations.