



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Mgr Michał Maciej Rakowski

**Ocena właściwości
antyoksydacyjnych ergotioneiny
i jej potencjalnej roli jako
czynnika przeciwdziałającego
neurodegeneracji**

Evaluation of the antioxidant properties
of ergothioneine and its potential role
against neurodegeneration

**Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem:
Promotora: dr hab. Agnieszki Grzelak
Uniwersytet Łódzki**

Łódź, 2023

Spis Treści

I. WYKAZ SKRÓTÓW	3
II. WSTĘP	7
CZY ERGOTIONEINA MA SZANSĘ STAĆ SIĘ NOWĄ WITAMINĄ?	7
BIOSYNTeza ERGOTIONEINY	10
TRANSPORT ERGOTIONEINY PRZEZ DWUWARSTWĘ LIPIDOWĄ	12
WEWNĄTRZUSTROJOWA LOKALIZACJA I METABOLIZM ERGOTIONEINY	15
ANTYOKSYDANT I CHELATOR?	16
III. CEL PRACY	18
IV. MATERIAŁY I METODY	19
HODOWLA KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH LINII SH-SY5Y I HEPG2	19
CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA ERGOTIONEINY (EGT) W TESTACH <i>IN VITRO</i>	20
OCENA PRZEŻYWALNOŚCI KOMÓREK LINII SH-SY5Y I HEPG2 TRAKTOWANYCH ERGOTIONEINĄ I INNYMI ZWIĄZKAMI.....	22
POMIAR GENERACJI REAKTYWNYCH FORM TLENU I AZOTU	23
OCENA WPŁYWU ERGOTIONEINY I LPS NA ROZKŁAD FAZ CYKLU KOMÓRKOWEGO W KOMÓRKACH LINII HEPG2	24
OCENA WPŁYWU ERGOTIONEINY NA INDUKCJĘ PROCESU APOPTOZY	25
POMIAR WPŁYWU LIPOPOLISACHARYDU I ERGOTIONEINY NA POZIOM METALOTIONEIN W KOMÓRKACH LINII HEPG2	25
OCENA MODULACJI AUTOFAGII PRZEZ EGT	27
OCENA AKTYWNOŚCI WYBRANYCH TRANSPORTERÓW Z RODZINY ABC	27
POMIAR AKTYWNOŚCI TRANSPORTERÓW ABCB1 Z UŻYCIEM KALCEINY	28
POMIAR AKTYWNOŚCI TRANSPORTERA ABCC1 Z UŻYCIEM FLUO-3	28
POMIAR AKTYWNOŚCI TRANSPORTERA ABCC1 Z UŻYCIEM BCECF-AM	28
ANALIZA EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW W KOMÓRKACH HEPG2 METODĄ QPCR	29
OCENA POZIOMU WYBRANYCH BIAŁEK W KOMÓRKACH HEPG2 I SH-SY5Y METODĄ WESTERN BLOT	31
ANALIZA STATYSTYCZNA UZYSKANYCH WYNIKÓW	33
VI. WYNIKI	35
POMIAR CAŁKOWITEJ WYDAJNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ ERGOTIONEINY <i>IN VITRO</i>	35
OCENA WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNYCH EGT W UKŁADZIE KOMÓRKOWYM	38
OCENA POTENCJAŁU EGT DO MODULACJI SYGNALIZACJI ZALEŻNEJ OD KINAZY GSK3	49
OCENA WPŁYWU ERGOTIONEINY NA KOMÓRKI LINII HEPG2	59
VII. DYSKUSJA	76
VIII. PODSUMOWANIE	102
IX. STRESZCZENIE	104
X. SUMMARY	106
XI. BIBLIOGRAFIA	107

I. Wykaz skrótów

6-OHDA – 6-hydroksydopamina

AA – kwas askorbinowy; ang. ascorbic acid

AAPH – dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny)

ABC – kasetka wiążąca ATP; ang. ATP-binding cassette

ABCB1 – kasetka wiążąca ATP B1

ABCC1 – kasetka wiążąca ATP C1

ABTS – sól diamonowa kwasu 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego)

AGEs – zaawansowane produkty glikacji; ang. advanced glycation end-products

ATCC – Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych; ang. American Type Culture Collection

A β – β -amyloid

b2m – gen kodujący białko β -2-mikroglobulinę

BCECF-AM – ester acetoksymetylowy

2',7'-Bis-(2-karboksyetylo)-5-(i-6)-karboksyluoresceiny

cAMP – cykliczny adenozylo-3,5-monofosforan

CD – choroba Leśniowskiego-Crohna; ang. Crohn's disease

Cdk5 – pierwsza kinaza zależna od cyklin; ang. cyclin dependent kinase 1

cGMP – cykliczny guanozylo-3,5-monofosforan

CisPt – cisplatyna

CKD – przewlekła choroba nerek; ang. chronic kidney disease

Cz.d.a. – czystość do analiz

DAF-FM-DA – dioctan 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny

DETA – DETA NONOate

DHE – dihydroetydyna

DHR123 – dihydrorodamina 123

DNIC – kompleks dinitrozylo-ditiolo-żelazowy

Dox – doksorubicyna; ang. doxorubicin

EFSA – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności; ang. European Food Safety Authority

EGT – ergotioneina

EMT – przejście epitelialno-mezenchymalne; ang. epithelial-mesenchymal transition

ER – retikulum endoplazmatyczne

ESOH – sulfonian ergotioneiny

ESSE – disiarczek ergotioneiny

Ex/Em – długość fali ekscytacji/emisji fluorescencji

FBS – cieleca surowica płodowa; ang. fetal bovine serum

FDA – Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych Ameryki; ang. Food and Drug Administration of United States of America

FRAP – test całkowitej zdolności antyoksydacyjnej do redukcji jonu żelazowego; ang. Ferric Reducing Antioxidant Power

GSH – zredukowana forma glutationu

GSK3 – kinaza syntazy glikogenu 3; ang. glycogen synthase kinase 1

GSSG – disiarczek glutationu

H₂DCF-DA – dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny

H33342 – Hoechst 33342

HBMECs – ludzkie komórki śródbłonna mikronaczyniowego mózgu; ang. Human Brain Microvascular Endothelial Cells

HeLa – linia komórkowa ludzkich komórek raka szyjki macicy

HepG2 – linia komórkowa ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego

His – histydyna

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa; ang. high-performance liquid chromatography

HRP – peroksydaza chrzanowa; ang. horseradish peroxidase

IC₅₀ – połowa maksymalnego stężenia hamującego

IL-1 β – interleukina 1 β

iNOS – indukowalna syntaza tlenku azotu

K562 – linia komórkowa ludzkich komórek białaczki szpikowej

L-C – L-cysteina

LPS – lipopolisacharyd

MD – menadion

MDC – monodansylokadaweryna; ang. monodansylcadaverine

MDR – zjawisko oporności wielolekowej; ang. multi-drug resistance

MEL – melatonina

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

mTOR – kinaza mTOR, ssaczy cel rapamycyny; ang. mechanistic target of rapamycin

mTORC1/2 – kompleks kinazy mTOR 1/2

N-18-RE-105 – hybrydowa linia komórkowa komórek neuronopodobnych utworzonych z komórek części wzrokowej siatkówki embrionu powstałego z myszy klasy N18TG2 i szczura rasy Fischer

NAFLD – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby ang. non-alcoholic fatty liver disease

NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-kappa B

OCTN1 – transporter kationów organicznych typu pierwszego; ang. organic cation transporter novel type 1

OVA – owalbumina; ang. ovalbumin

p-GSK3 β – ufosforylowana kinaza glikogenu 3 beta

p-GSK3 β (Ser9) – ufosforylowana w pozycji Seryny 9 kinaza glikogenu 3 beta

p-ULK1 (Ser757) – białko ULK1 ufosforylowane w pozycji 757 na reszcie serynowej

PC12 – linia komórkowa szczurzych komórek guza chromochłonnego

PDZK1 – kofaktor regulujący wymianę jonów Na⁺/H⁺; ang. PDZ domain containing 1

PI – jodek propidyny; ang. propidium iodide

PVDF – polifluorek winylidenu

qPCR – ilościowy pomiar cyklicznej reakcji polimerazy

RFA – reaktywne formy azotu

RFT – reaktywne formy tlenu

rpl13a – gen kodujący białko rybosomalne L13a

SD – odchylenie standardowe; ang. standard deviation

SEM – średni błąd średniej; ang. standard error of the mean

Ser – seryna

SH-SY5Y – linia komórkowa ludzkich komórek nerwiaka zarodkowego

SIRT – sirtuiny

SLC – rodzina transporterów przez błonowych; ang. solute carrier

SLC22A4 – solute carrier family 22, member 4

SLC7A1 – solute carrier family 7, member 1

SLC7A5 – solute carrier family 7, member 5

TBOOH – wodoronadtlenek tert-butyłu

TE – równoważnik troloksu; ang. Trolox Equivalent

TEAC – test całkowitej zdolności antyoksydacyjnej równoważników troloksu; ang. trolox equivalent antioxidant capacity

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu beta

THP-1 – linia komórkowa ludzkich monocytów
TLR – rodzina receptorów toll-podobnych; ang. toll-like receptor
TLR4 – receptor toll-podobny 4; ang. toll-like receptor 4
TMAO – n-tlenek trimetyloaminy
U-138 – linia komórkowa ludzkich komórek glejaka wielopostaciowego IV stopnia
U-698 – linia komórkowa ludzkich komórek chłoniaka
UA – kwas moczowy; ang. uric acid
ULK1 – pierwsza kinaza Unc-51-podobna; ang. Unc-51-like kinase 1
USA – Stany Zjednoczone Ameryki
VCAM-1 – pierwsza cząsteczka adhezyjna śródbłonna; ang. vascular cell adhesion molecule 1
 \bar{X} - średnia arytmetyczna
ZEB1 – Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZO1 – zonula occludens 1

II. Wstęp

Ergotioneina (EGT) to jedna z wielu substancji pochodzenia naturalnego o działaniu prozdrowotnym na organizmy eukariotyczne. Z uwagi na obecność grupy -SH zalicza się ją do grupy związków tiolowych. W fizjologicznym pH atom wodoru oddysocjowuje od atomu siarki, zmieniając strukturę EGT z tiolowej w tiomocznikową. Ugrupowanie tiomocznikowe umiejscowione na pierścieniu imidazolowym znacznie ogranicza samoutlenianie EGT w roztworach wodnych, w porównaniu do innych związków tiolowych. EGT transportowana jest do wnętrza komórek przez białko błonowe SLC22A4 występujące we wszystkich komórkach organizmu ludzkiego [1].

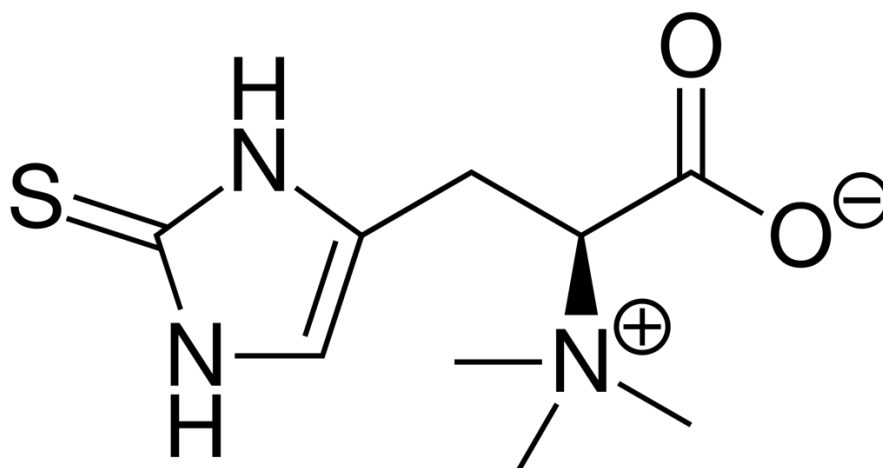
EGT syntezują głównie grzyby, niektóre bakterie i drożdże. U producentów EGT pełni funkcję antyoksydacyjną. Niektóre z mikroorganizmów, z uwagi na niezdolność do syntezy glutationu (GSH), wykorzystują EGT jako główny małowczątkowy związek przeciwutleniający. W organizmach eukariotycznych EGT funkcjonuje jako przeciwutleniacz, choć wiele wskazuje, że związek ten może brać udział w bardziej złożonych procesach.

Wchłaniana w jelicie cienkim EGT akumulowana jest we wszystkich komórkach organizmu ludzkiego. Utleniona EGT ulega regeneracji na drodze wieloetapowego i nieenzymatycznego cyklu, w którym uczestniczą cztery cząsteczki GSH [2]. EGT wykazuje także zdolność do chelatowania dwuwartościowych jonów metali [3].

EGT wykazuje działanie antyoksydacyjne, neuroprotektoryjne i przeciwstarzeniowe. Zyskała miano witaminy długowieczności w związku z wykazaniem dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem EGT we krwi a średnią długością życia [4].

Czy ergotioneina ma szansę stać się nową witaminą?

EGT odkryto w 1909 roku podczas badań na sporyszu, od którego wzięła swoją nazwę (z francuskiego *ergot*) [5]. Związek ten wyróżnia się, spośród innych związków pochodzenia roślinnego, ogólnoustrojową akumulacją i bardzo niskim stopniem wydalania (zaledwie 4% pierwotnego stężenia wydalane jest wraz z moczem) [6]. EGT jest pochodną histydyny (His), od której różni się m.in. występowaniem ugrupowania tiomocznikowego w budowie chemicznej (Ryc. 1). W roztworach wodnych występuje jako tautomer pomiędzy formą tiomocznikową a tiolową – w fizjologicznym pH dominuje forma tiomocznikowa warunkująca stosunkowo wysoki potencjał redoks równy 60 mV [7]. EGT chelatuje jony metali przejściowych (np. Cu^{2+} i Fe^{2+}), w wyniku tej reakcji powstaje stabilny dimer, składający się z dwóch cząsteczek EGT i jonu metalu [8,9].



Rycina 1. Wzór strukturalny tiomocznikowej formy ergotioneiny.

Za sprawą transportera SLC22A4, EGT dociera do wszystkich komórek organizmu ludzkiego [10–12]. Zaproponowano istnienie związku pomiędzy spożyciem EGT a zmniejszeniem śmiertelności, wydłużeniem przewidywanego czasu życia oraz zmniejszeniem zapadalności na choroby neurodegeneracyjne [4]. EGT przyporządkowuje się do grupy nutraceutyków, czyli grupy substancji odżywczych o aktywnym działaniu prozdrowotnym.

W przyrodzie EGT jest wszechobecna [13], choć jej akumulacja w łańcuchach troficznym różni się w zależności od odległości od producenta. Do głównych producentów EGT należą grzyby oraz niektóre drożdże [14], choć mniejsze ilości EGT produkują także inne organizmy np. promieniowce (*Actinomycetes*) czy sinice (*Cyanobacteria*) [15]. Obecność EGT w roślinach wyższego rzędu jest wynikiem pobierania tego związku z gleby, w której bytują mikroorganizmy, bądź też symbiozy z grzybami lub bakteriami [16]. Pozostałe organizmy pobierają EGT z wodą bądź pokarmem. Zawartość EGT w produktach spożywczych jest dość zróżnicowana [17]. Zdecydowanie największej ilości EGT w diecie człowieka dostarczają grzyby (Tab. 1). Wyróżniają się one do tego stopnia, że EGT została zaproponowana jako biomarker spożycia grzybów przez ludzi [18]. Najwięcej EGT zawierają grzyby z rodzaju boczników (*Pleurotus sp.*, średnio do 4 mg/g suchej masy) np. bocznik cytrynowy (*Pleurotus citrinopileatus*, 10-65 mg/g suchej masy), choć inne, jak grzyb shiitake (*Lentinula edodes*, około 1 mg/g suchej masy), również cechują się wysoką zawartością EGT [19–21]. Pieczarka dwuzarodnikowa (*Agaricus bisporus*) zawiera niewiele EGT (ok. 0,15 – 0,4 mg/g suchej masy) ale jest często spożywana i może stanowić znaczące źródło EGT w diecie [22]. Pośród europejskich grzybów najwyższą zawartością EGT

wyróżnia się borowik szlachetny (*Boletus edulis*), zawierający ponad 7 mg EGT/g suchej masy owocnika [23]. Tempeh, czyli ugotowane ziarna soi poddane procesowi fermentacji przeprowadzanemu przez *Rhizopus oligosporus*, zawiera około 0,2 mg EGT/g suchej masy [17].

Tabela 1. Zawartość ergotioneiny w różnych typach produktów spożywczych wyrażona w mg EGT/100 g suchej masy produktu.

Tabelę sporządzono na podstawie Halliwell i wsp. (2018) [17].

Grzyby	mg/100 g	Owoce i warzywa	mg/100 g	Inne	mg/100 g
<i>Boletus edulis</i>	181,24	Czosnek	3,46	Tempeh	20,11
<i>Pleurotus eryngii</i>	54,17	Algi z rodzaju <i>Pyropia</i>	0,234	Liść bazylii	0,492
<i>Hypsizygus tessellatus</i>	43,26	Pasternak	0,223	Orzechy brazylijskie	0,445
<i>Lentinula edodes</i>	35,35	Kiwi	0,199	Pieprz czarny	0,257
<i>Flammulina filiformis</i>	34,64	Cebula	0,113	Napój sojowy	0,231
<i>Agaricus bisporus</i>	15,44	Brokuł	0,038	Pistacje	0,19
<i>Grifola frondosa</i>	2,02	Pomidor	0,02	Mleko krowie	0,025

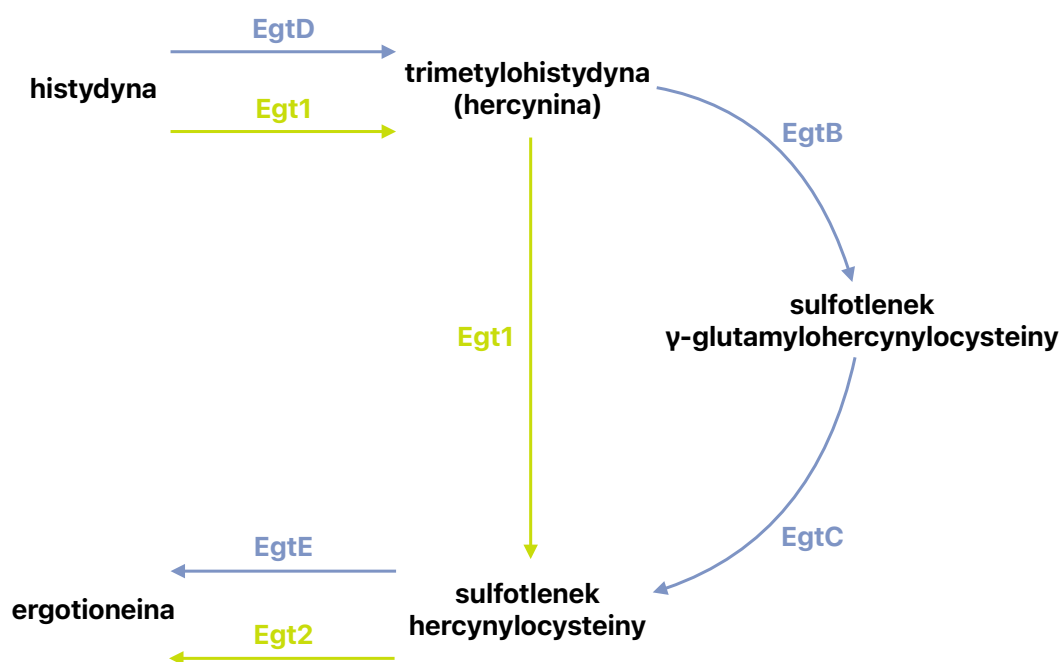
C. purpurea wytwarza EGT w celu ochrony przed systemami obronnymi roślin opartymi na wyrzucie nadtlenu wodoru, co powoduje inhibicję produkcji konidii [24]. Prątki gruźlicy (*M. tuberculosis*) oraz inni przedstawiciele rodzaju *Mycobacterium* również wykorzystują antyoksydacyjne właściwości EGT, podobnie jak promieniowce czy większość grzybów [25–27]. Grzyby często produkują EGT jako pierwszą linię obrony antyoksydacyjnej [21].

EGT *in substantia* występuje jako biały, drobny proszek, jest bezzapachowa i delikatnie słodka w smaku [28]. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Standards Agency; EFSA) w 2016 roku określił EGT jako substancję bezpieczną do stosowania jako dodatek do różnych grup żywności oraz jako suplement diety [29]. Panel ds. żywienia, nowej żywności i alergenów pokarmowych działający pod jurysdykcją EFSA ustalił dawkę EGT 800 mg/kg masy ciała jako poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków w modelu zwierzęcym. Rekomendowane dawki dziennego spożycia EGT określone zostały przez EFSA na poziomie 30 mg/dziennie dla osób dorosłych i 20 mg/dziennie dla dzieci. Aktualizacja raportu wydana rok później uszczegółowiła dopuszczalne dawki u kobiet w ciąży oraz niemowląt, po raz kolejny potwierdzając bezpieczeństwo wykorzystania EGT jako dodatku do żywności [30].

Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych Ameryki (U.S. Food and Drug Administration; FDA) w 2017 roku wydała oświadczenie o nadaniu EGT statusu substancji powszechnie uznawanej za bezpieczną (Generally Recognized as Safe) i zarekomendowała stosowanie 5 mg/porcję EGT w dodatkach do żywności [31]. Przed ogłoszeniem powyższych rekomendacji opublikowano wyniki kilku badań nad toksycznością EGT. Na modelu zwierzęcym sprawdzono toksyczność ostrą (2000 mg/kg/dzień) i toksyczność przewlekłą (725 mg/kg/dzień przez 92 dni) EGT [32]. Po przeliczeniu tych wartości na średnią masę dorosłego człowieka (62 kg) otrzymujemy wartości równe 124 g dla toksyczności ostrej i 45 g/dziennie dla toksyczności przewlekłej. Nawet tak duże ilości EGT nie powodowały u szczurów żadnych objawów niepożądanych a dawka 725 mg/kg/dzień nie prowadziła do zmian w płodności czy przebiegu ciąży u zwierząt. Nie odnotowano żadnych niepokojących zmian fizjologicznych lub klinicznych u potomstwa badanych zwierząt. EGT nie wykazuje również działania mutagennego ani klastogennego [33,34]. Jest w pełni bezpieczna w dawce 25 mg/dziennie przez siedem dni u zdrowych osób poniżej 30 roku życia [6].

Biosynteza ergotioneiny

Literatura przedmiotu opisuje dwa główne szlaki syntezy EGT, różniące się udziałem enzymów i obecnością produktów pośrednich. Synteza EGT rozpoczyna się trimetylacją histydyliny katalizowaną przez enzym EgtD [16] (lub Egt1 [35]) przy udziale S-adenozylometioniny (Schemat 1). Kolejno, w obecności tlenu cząsteczkowego oraz dwuwartościowych jonów żelaza trimetylohistydylina zostaje przekształcona przez Egt-1 do sulfotlenku hercynylocysteiny [36]. Reakcja ta może być poprzedzona etapem katalizowanym przez EgtB, podczas którego trimetylohistydylina reaguje oksydacyjnie z γ -L-Glutamyl-L-cysteiną tworząc sulfotlenek γ -glutamylhercynylocysteiny [37], z której na drodze reakcji katalizowanej przez EgtC powstaje sulfotlenek hercynylocysteiny. Jest on następnie przekształcany w EGT przez EgtE lub Egt2 [16,38]. Różnica w przebiegu tych dwóch szlaków wynika z budowy enzymów przeprowadzających początkowe reakcje syntezy – enzym Egt1, wywodzący się z *Neurospora crassa*, zbudowany jest z 876 aminokwasów, podczas gdy przeprowadzający pierwszą reakcję enzym EgtD z *Mycobacterium tuberculosis* z 321 aminokwasów [16]. Białka te wykazują wysoki stopień homologii części N-końcowej, dlatego najprawdopodobniej Egt1 zawiera w części C-końcowej domenę katalizującą przekształcenie trimetylohistydyliny do sulfotlenku hercynylocysteiny [16], czego brak EgtD.



Schemat 1. Schemat przedstawia proces syntezy ergotioneiny wraz z oznaczonymi enzymami katalizującymi poszczególne etapy reakcji chemicznych. Sporządzono na podstawie Borodina i wsp. (2020) [16].

Niektóre bakterie z rzędu promieniowców (*Actinomycetes sp.*) wykazują ekspresję enzymów przeprowadzających biosyntezę EGT. Biosynteza ta rozpoczyna się metylacją grupy aminowej histydyny – powstaje hercynina, która następnie przyjmuje atom siarki transferowany na pierścień imidazolowy z cysteiny [15]. U bakterii EGT pełni funkcję ochronną przed stresem środowiskowym czy metalami ciężkimi [39]. Mikroorganizmy syntetyzują także inne niskocząsteczkowe związki tiolowe, takie jak glutation, które w podobnym stopniu przyczyniają się do utrzymania równowagi redoks. Przykładem może być *M. tuberculosis* produkujący wzajemnie się uzupełniające mykotiol, EGT i γ -Glu-Cys, dzięki którym jest w stanie przetrwać w warunkach wzmożonego stresu oksydacyjnego [40].

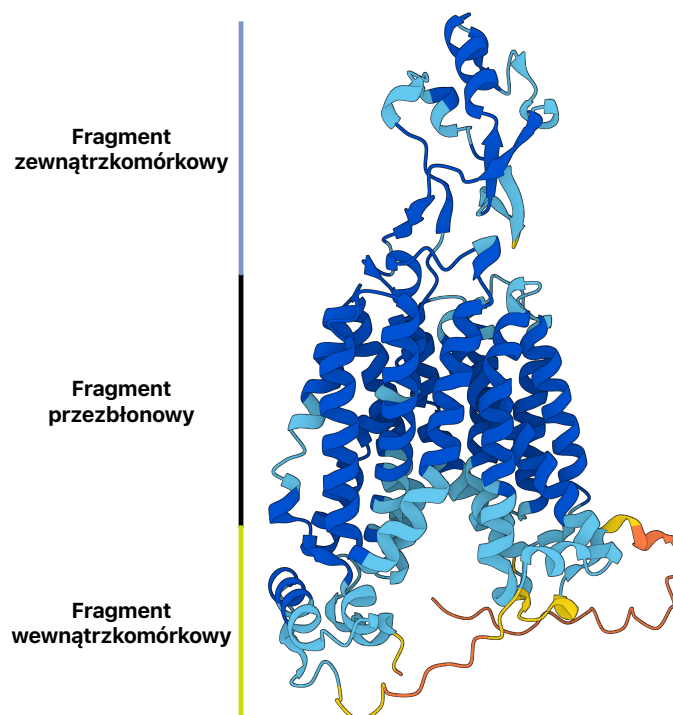
W 2014 roku uzyskano transgeniczny model *Schizosaccharomyces pombe* z genem *egt1*⁺ pod kontrolą indukowalnego promotora *nmt*⁺, aktywowanego przez brak tiaminy w środowisku [41]. Poprzez indukcję ekspresji genu *egt1*⁺ w *S. pombe* uzyskano produkcję EGT na poziomie 1606,3 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, podczas gdy szczep typu dzikiego nie przekroczył poziomu 0,3 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ [41].

Funkcję analogiczną do Egt1 pełnią enzymy EgtD i EgtB. Model *M. aquaticum* szczepu 22A z wbudowanymi dodatkowymi kopiami genów *egtB* i *egtD* oraz delecją genu liazy

amoniakalnej histydyny wykazywał syntezę EGT do 7 mg EGT/g suchej masy komórek i 100 μg EGT/5 cm^3 po siedmiu dniach hodowli [42]. Na podstawie modelu opartego o *E. coli* odkryto, że gen *gshA* kodujący homolog genu *egtA* nie jest wystarczająco wydajny do syntezy EGT [43,44]. Wbudowanie genu *egtA*, wraz z genami kodującymi pozostałe enzymy, do genomu bakterii z jednoczesną stymulacją syntezy cysteiny i S-adenozynometioniny w komórkach bakterii *E. coli* pozwoliło uzyskać syntezę EGT na poziomie 1-3 g/dm^3 [44]. Produkowana w ten sposób EGT była wydzielana zewnątrzkomórkowo. Poza układami czysto bakteryjnymi do produkcji EGT stosować można również hodowle drożdżowe.

Transport ergotioneiny przez dwuwarstwę lipidową

W organizmie człowieka transport EGT do komórek zależny jest od transportera kationów organicznych typu pierwszego (organic cation transporter novel type 1, OCTN1), coraz częściej nazywanego SLC22A4 (od nazwy genu). Transporter SLC22A4 składa się z 551 aminokwasów, zawiera trzy miejsca glikozylacji i 11 domen przezbłonowych (Rycina 2) [45].



Rycina 2. Struktura transportera SLC22A4 umiejscowiona w błonie komórkowej z oznaczeniem części zewnętrznej, przezbłonowej oraz wewnętrznej białka. Strukturę białka pobrano z sieci AlphaFold [46,47].

Praca opublikowana w 2005 roku przez Gründemann i wsp. [1] była przełomowa dla poznania mechanizmu transportu EGT – metodą radioizotopową wykazano, że obserwowane dla SLC22A4 wskaźniki transportu karnityny i tetraetyloamonu są zbyt niskie by mogły zostać uznane za fizjologicznie znaczące. Jednym ze specyficznie pobieranych związków przez OCTN1 była stachydryna, substancja występująca w dużych ilościach w owocach cytrusowych [48]. Bioinformatyczna analiza homologii strukturalnej wskazała na EGT jako związek o podobnej budowie a eksperymenty wykazały, że EGT jest ponad 100-krotnie wydajniej importowana do wnętrza komórek niż kation tetraetyloamoniowy [1]. Transport jednej cząsteczki EGT przez SLC22A4 jest połączony z importem dwóch lub trzech jonów sodu [1]. Poza EGT, SLC22A4 transportuje również (Tab. 2) m.in. acetylocholinę [49], karnitynę [50] czy sperminę [51], a także kilkadziesiąt farmaceutyków – np. werapamil [52], który jest jednocześnie inhibitorem SLC22A4 [53], gabapentynę [54] czy metforminę [10,55].

Tabela 2. Substraty endogenne i pochodzenia naturalnego oraz leki transportowane przez białko SLC22A4. Tabelę sporządzono na podstawie Pochini i wsp. (2022) [10].

Substraty endogenne i pochodzenia naturalnego		Leki		
Acetylocholina	Karnityna	Amisulpryd	Buformina	Klofarabina
Cholina	2'-Deoksycytydina	Cytarabina	Emtrycytabina	Entekawir
Ergotioneina	Homostachydryna	Etambutol	Fludarabina	5'-Fluorouracyl
Spermina	Stachydryna	Gabapentyna	Gemcytabina	Ipratropium
		Metformina	Oksaliplatyna	Fenformina
		Pyrilamina	Chinidyna	Rybawiryna
		Sarakatynib	Tiotropium	Werapamil

Interesujące zjawisko dotyczące aktywności SLC22A4 przedstawiono w pracy Akamine i wsp. [56]. Zauważono, że wchłanianie transportowanej przez SLC22A4 pregabaliny jest zależne od pory dnia podania leku szczurom – wchłanianie leku było najwyższe tuż przed porą karmienia, co potwierdziła analiza poziomu białka SLC22A4. Sugeruje to możliwość działania chronobiologicznego, uzależnionego od rutynowych czynności – w tym przypadku od posiłku. U ssaków wchłanianie EGT rozpoczyna się w świetle jelita cienkiego [16]. Wydaje się więc, że absorpcja EGT z pokarmu byłaby najbardziej efektywna przy zachowaniu rutynowych pór spożywania posiłków, niemniej jednak to zjawisko wymaga dalszych badań.

Transporter SLC22A4 występuje powszechnie w tkankach człowieka [10]. Informacji o rozkładzie ilościowym SLC22A4 w organizmie człowieka dostarczają m.in. dane z pomiarów przeprowadzonych na liniach komórkowych. Jedną z najwyższych ekspresji SLC22A4 cechują się komórki glejaka wielopostaciowego IV stopnia (*Glioblastoma multiforme*) linii U-138 MG (ok. 30 kopii genu na milion kopii), medianę stanowią monocyty linii THP-1 (ok. 2-3 kopie na milion), zaś najmniej transkryptów SLC22A4 wykryto w komórkach ludzkiego chłoniaka linii U-698 (0,01 kopii na milion) [57,58]. Można więc uznać, że SLC22A4 występuje powszechnie w komórkach organizmu ludzkiego, choć pomimo wielu potwierdzających tę tezę publikacji [10] pojawiają się również doniesienia np. o niewykrywalnym ($< 30 \text{ fmol/dm}^3$) poziomie SLC22A4 w ludzkich komórkach śródbłonna mikronaczyniowego pochodzącego z 17 i 39 pola Broadmanna [59]. Budzi to wątpliwości w obliczu dotychczasowych doniesień o obecności SLC22A4 w barierze krew-mózg [12,60].

Modulacja aktywności bądź syntezy transportera SLC22A4 może prowadzić do rozwoju stanów chorobowych. Nokaut genu *slc22a4* u myszy prowadzi do zwiększonego stresu oksydacyjnego i zahamowania transportu EGT [61]. Z kolei polimorfizmy genu *slc22a4* powiązane z chorobami takimi jak: udar niedokrwienny [62], utrata słuchu [63], reumatoidalne zapalenie stawów [64] czy choroba Leśniowskiego-Crohna [65]. W układzie komórkowym wyciszenie genu *slc22a4* za pomocą shRNA powoduje spadek wydajności transportu [^3H]EGT ($4,5 \mu\text{mol/dm}^3$) o około 75% względem komórek kontrolnych oraz obniżenie ilości komórek ulegających różnicowaniu w erytrocyty [66]. U myszy chorych na przewlekłą chorobę nerek (chronic kidney disease; CKD) stwierdzono istotnie niższą wydajność wchłaniania EGT [67]. Spowodowane jest to obniżoną ekspresją białka PZDK1, odpowiedzialnego za regulację lokalizacji białek transportowych, w tym SLC22A4. Z kolei nokaut genu *slc22a4* u myszy z CKD podnosi poziom markerów zwłóknienia nerek (kreatyniny i mocznika) i markerów stresu oksydacyjnego (4-hydrokso-2-nonenalu i karbonylowanych białek) we krwi. Podobne zmiany zaobserwowano u pacjentów chorych na CKD a także odnotowano niższe niż u osób zdrowych stężenie EGT, które ulega deterioracji w miarę progresji choroby. Na poziomie komórkowym, wyciszenie ekspresji SLC22A4 indukowane przez siRNA, uwrażliwia komórki HeLA na działanie stresu oksydacyjnego indukowanego nadtleniem wodoru ($0,5 \text{ mmol/dm}^3$), prowadząc do zwiększenia karbonylacji białek i peroksydacji lipidów [68].

Rodzina białek transportowych typu SLC powiązana została dotychczas ze znacznie większą ilością chorób [69], jest więc wysoce prawdopodobne, że lista powiązań dla

SLC22A4 będzie wzrastać. W przyszłości SLC22A4 może stać się interesującym celem terapeutycznym. Wiedza o występujących polimorfizmach genu *slc22a4* i chorobach z nimi związanych byłaby doskonałym czynnikiem prognostycznym i diagnostycznym.

Wewnątrzustrojowa lokalizacja i metabolizm ergotioneiny

EGT preferencyjnie gromadzi się w tkankach bardziej narażonych na stres oksydacyjny [3]. Wchłaniana jest z pokarmu w jelicie cienkim i dalej przekazywana do krwi, skąd trafia do pozostałych tkanek organizmu. Stężenie EGT w surowicy zależy przede wszystkim od diety badanego [70]. Wpływ mają również post [71], wiek [72] i choroby związane ze stanem zapalnym, jak np. choroba Leśniowskiego-Crohna [61]. EGT podawana doustnie cechuje się wysoką wchłaniałością z przewodu pokarmowego. Średnie stężenie EGT zmierzone w osoczu pobranym od pięciu zdrowych, dorosłych osób wynosiło $107,4 \pm 20,5$ ng/cm³, podczas gdy stężenie zmierzone w erytrocytach wynosiło $1285,0 \pm 1363,0$ ng/cm³ [73]. Dane na temat zawartości EGT w ludzkich erytrocytach i szczurzych narządach zostały zestawione przez Cheah i Halliwell w pracy przeglądowej z 2012 roku [3]. Na jej podstawie oszacować można, że średnie stężenie EGT wynosi w:

- ludzkich erytrocytach $4,45 \pm 2,62$ mg/100 cm³,
- szczurzych erytrocytach $2,03 \pm 2,17$ mg/100 cm³,
- wątrobie szczura $7,66 \pm 4,03$ mg/g,
- nerce szczura $3,62 \pm 2,41$ mg/g,
- jądrach szczura $0,37 \pm 0,18$ mg/g,
- mózgu szczura $0,31 \pm 0,14$ mg/g.

Znaczne zróżnicowanie wyznaczonych stężeń może być wypadkową różnych metod pomiarowych stosowanych do oceny poziomu EGT, w szczególności metod chemicznych o wysokim progu detekcji oraz aparatury o niewielkiej selektywności. Szczególnie zauważalne jest to w przypadku pomiarów EGT w szczurzych erytrocytach – wyniki uzyskane za pomocą chemicznych metod pomiarowych zawierały się w zakresie $1,6 - 5,3$ mg/100 cm³, podczas gdy stężenia zmierzone metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (high-performance liquid chromatography; HPLC) były znacznie niższe i wynosiły $0,21 - 0,67$ mg/100 cm³. Stosowane w przeszłości metody kolorymetryczne nie były tak czułe jak obecnie stosowane HPLC czy spektrometria mas (mass spectrometry; MS) i nie wykluczały potencjalnie obecnych w próbce zanieczyszczeń. Rozbieżności powodował również brak standaryzacji metod chemicznych, gdyż część z nich

była autorsko modyfikowana. Jak sugerują Cheah i Halliwell [3] niektóre z pierwotnie stosowanych metod mogły także nie uwzględniać EGT związanej z białkami.

Metabolizm i wydalanie EGT u ssaków przebiega stosunkowo wolno [6]. Podawana zdrowym pacjentom przez siedem dni w dawce 5-25 mg/dziennie nie powoduje skutków ubocznych [6]. Głównymi produktami metabolizmu EGT były N,N,N-trimetylo-histydyna i S-metylo-EGT, których wydalane stężenia były ściśle zależne od przyjętych dawek EGT. W przypadku niektórych pacjentów odnotowano również obniżenie stężenia markerów stresu oksydacyjnego – alantoiny, 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny czy 8-iso-PGF2 α – niestety wyniki nie były istotne statystycznie.

U myszy karmionych standardową dietą laboratoryjną (zawierającą $5,63 \pm 0,33$ ng/mg EGT) najwięcej EGT lokalizuje się w wątrobie ($80,65 \pm 4,14$ ng/mg), krwi pełnej ($58,99 \pm 2,05$ ng/ μ l), śledzionie ($36,45 \pm 3,72$ ng/mg) i nerkach ($27,61 \pm 2,61$ ng/mg) [74]. Trwająca 28 dni suplementacja EGT w ilości 70 mg/kg/dzień spowodowała wzrost stężenia EGT w wątrobie 2,5-krotnie, krwi pełnej 3,3-krotnie, śledzionie 1,5-krotnie, nerkach 4,8-krotnie, płucach 2,5-krotnie, sercu 2,3-krotnie, jelicie cienkim 1,9-krotnie, gałce ocznej 2,6-krotnie, jelicie grubym 3-krotnie, zaś w mózgu 2,9-krotnie. Wzrost stężenia N,N,N-trimetylo-histydyny korelował ze wzrostem stężenia EGT – najwyższe stężenie tego metabolitu zmierzono w wątrobie ($869,10 \pm 76,53$ pg/mg), krwi pełnej ($544,53 \pm 21,02$ pg/ μ l), śledzionie ($368,92 \pm 22,13$ pg/mg) i nerkach ($184,81 \pm 22,45$ pg/mg). Sulfonian ergotioneiny był niewykrywalny w wątrobie, gałce ocznej i mózgu, a w płucach występował w najwyższym stężeniu. Najwyższe stężenie S-metylo-EGT zmierzono w wątrobie [74].

Antyoksydant i chelator?

Endogenne związki tiolowe biorą udział w utrzymaniu równowagi redoks we wszystkich przedziałach komórki [75]. Charakterystyczną cechą związków tiolowych jest zdolność do odwracalnych reakcji utleniania. Proces redukcji katalizowany jest przez oksydoreduktazy i oksydazy tiolowe [76].

Choroby związane z przewlekłą indukcją stanu zapalnego cechuje nieustannie występujący stres oksydacyjny [77]. Regularna podaż egzogenego związku antyoksydacyjnego – w szczególności wchłanianego w jelicie cienkim – mogłaby przynieść pozytywne efekty np. w chorobie Leśniowskiego-Crohna. W literaturze przedmiotu dowiedziono, że EGT reaguje z tlenem singletowym [2], rodnikiem hydroksylowym [39], nadtlenkami [78], podchlorynem [79] i nadtlenoazotynem [80]. Najwyższą reaktywność

wykazuje względem $\cdot\text{OH}$, NO_2 i tlenu singletowego $^1\text{O}_2$ [2]. Ogromną przewagą EGT nad innymi związkami o działaniu antyoksydacyjnym jest zdolność do odtwarzania pierwotnej struktury w cyklicznej reakcji redukcji katalizowanej i zależnej od pary GSH/GSSG [2]. Utleniona EGT występująca w formie dimeru (ESSE) i może zostać zredukowana przez GSH na drodze wymiany tiolowo-disiarczkowej lub ulec rozkładowi do EGT i reaktywnej pochodnej kwasu sulfenowego (ESOH). Następnie w wyniku reakcji dwóch cząsteczek ESOH powstaje jedna cząsteczka EGT i pochodna kwasu sulfinowego, która jest przekształcana do hercyniny i kwasu siarkowego [78,79]. Możliwość regeneracji utlenionej EGT bez specyficznego czynnika redukującego czy reakcji enzymatycznej umożliwia utrzymanie względnie stałego stężenia EGT w komórkach organizmu [79].

EGT wykazuje również działanie chelatujące jony metali przejściowych. Oddziałuje ona z jonami dwuwartościowymi takimi jak Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} czy Co^{2+} [81,82]. Najwyższą stabilnością cechują się kompleksy z jonami miedzi, cynku i rtęci. Inkubacja EGT z metaloenzymami zawierającymi w centrum katalitycznym jony cynku nie prowadzi do inhibicji ich aktywności. Spośród metaloenzymów zawierających w centrum aktywnym jon miedzi tylko oksydazy polifenolowe ulegają odwracalnej inhibicji przez EGT (w zakresie 55 – 90%). W odróżnieniu od innych stosowanych enzymów, oksydazy polifenolowe w centrum katalitycznym zawierają jon miedzi Cu^+ , podczas gdy pozostałe testowane enzymy zawierają Cu^{2+} [82].

EGT ($0,2 \text{ mmol/dm}^3$) z 99,7% wydajnością powoduje inhibicję reakcji karbonylacji albuminy, poprzez wytworzenie kompleksu EGT- Cu^+ z jonem miedzi zredukowanym przez askorbinian, co zapobiega wytwarzaniu RFT na drodze cyklicznych reakcji redoks z udziałem askorbinianu i jonów miedzi [9]. EGT jest porównywalnie wydajnym chelatorem jonów miedzi jak specyficzny chelator jonów miedzi – disulfonian batokuproiny (1 mmol/dm^3). W układach biologicznych EGT wykazuje zdolność zapobiegania uszkodzeniom DNA indukowanym przez jony miedzi [9,83]. Powyższe informacje wskazują, że EGT jest substancją wykazującą właściwości prozdrowotne, a zrozumienie mechanizmów jej działania na poziomie komórkowym, poprawi bezpieczeństwo stosowania jej jako nutraceutyka.

III. Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy było ustrukturyzowanie i uzupełnienie dostępnych danych w celu wyjaśnienia zasady neuroprotekcynnego działania EGT oraz sformułowanie odpowiedzi na hipotezę badawczą zakładającą, że *ergotioneina indukuje efekt neuroprotekcynny pełniąc rolę cząsteczki sygnałowej*.

Wnioskowanie o neuroprotekcynnym działaniu EGT było w literaturze dotychczas oparte o modele zwierzęce oraz pochodzące od zwierząt linie komórkowe o niestabilnym kariotypie (np. linia komórkowa PC12).

W celu doprecyzowania mechanizmu działania EGT w ludzkich komórkach nowotworowych postawiono następujące cele:

- 1) Ocenę potencjału antyoksydacyjnego EGT w odniesieniu do innych antyoksydantów różniących się mechanizmem działania;
- 2) Wyjaśnienie mechanizmu działania neuroprotekcynnego EGT w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu związków o działaniu utleniającym;
- 3) Ocena właściwości ochronnych i sygnalizacyjnych EGT w komórkach raka wątrobowokomórkowego linii HepG2.

IV. Materiały i metody

Odczynniki takie jak sole nieorganiczne, kwasy, zasady i rozpuszczalniki stosowano najwyższej możliwej czystości. O ile nie napisano inaczej, odczynniki zakupiono od firmy Merck (Darmstadt, Niemcy) lub Chempur (Piekary Śląskie, Polska). Do sporządzania roztworów wodnych wykorzystywano, oczyszczaną w układzie dejonizacja-odwrócona osmoza, wodę z aparatu MilliQ (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA).

L-ergotioneinę (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Teksas, USA) do doświadczeń przygotowano w następujący sposób: EGT rozdzielano po 2 mg *in substantia* do probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C do momentu użycia. W dniu eksperymentu EGT rozmrażano i rozpuszczano w PBS w celu uzyskania właściwego stężenia. Roztwór filtrowano przez filtr o porach 0,22 µm (Merck Millipore) i wykorzystywano do doświadczeń. Roztwór EGT przechowywano w 4°C przez maksymalnie 24 godziny.

Materiały zużywalne stosowane w niniejszej pracy to jednorazowe, sterylne butelki hodowlane o powierzchni nominalnej 25 cm² lub 75 cm² (Sarstedt; Nümbrecht, Niemcy), jednorazowe sterylne pipety serologiczne o pojemności 10, 25 lub 50 cm³, probówki wirownicze typu „falcon” o pojemności 15 i 50 cm³ (Greiner Bio-One; Kremsmünster, Austria), płytki hodowlane 96-, 24-, 12- i 6-dołkowe (Nunc, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA), probówki typu Eppendorf o pojemnościach 1,5 cm³ lub 2 cm³ i probówki do pomiarów cytofluorymetrycznych (BD Biosciences; Franklin Lakes, New Jersey, USA).

Pomiary absorpcyjometryczne, luminometryczne i fluorymetryczne przeprowadzano z wykorzystaniem czytnika płytek EnVision firmy PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA). Pomiary cytofluorymetryczne prowadzono za pomocą cytometrów przepływowych LSRII lub Symphonia firmy BD Biosciences. Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono z wykorzystaniem aparatury firmy Bio-Rad (Hercules, Kalifornia, USA). Chemiluminescencyjną wizualizację membran PVDF wykonywano w komorze do analizy chemiluminescencji UVITEC Cambridge Alliance HD4 Mini (Cambridge, Zjednoczone Królestwo Wielkiej Brytanii i Irlandii Północnej). Oceny morfologii komórek dokonywano z wykorzystaniem mikroskopu Nikon Eclipse Ti-U (Tokio, Japonia).

Hodowla komórek eukariotycznych linii SH-SY5Y i HepG2

Komórki eukariotyczne hodowano zgodnie z zaleceniami wydanymi przez Amerykańską Kolekcję Kultur Typowych (American Type Culture Collection; ATCC; Manassas,

Wirginia, USA). Hodowlę komórek prowadzono w temperaturze 37°C, 5% nasyceniu CO₂ i 95% wilgotności, w inkubatorze Thermo Scientific (dalej jako „warunki standardowe”). Linie komórkowe były co trzy miesiące sprawdzane na obecność zakażenia *Mycoplasma sp.* testem MycoProbe[®] Mycoplasma Detection Kit firmy R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA).

Komórki linii wyprowadzonej z ludzkiego nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y hodowano w pożywce DMEM/F12 (Ham) firmy Gibco nr. kat. 11330032 (Thermo Fisher Scientific), o zawartości glukozy 17,5 mmol/dm³ suplementowanej do 10% cielecą surowicą płodową (FBS; EurX; Gdańsk, Polska). Pasaż przeprowadzano po osiągnięciu przez hodowlę komórkową ok. 90% konfluencji monowarstwy. Procedurę rozpoczynano poprzez przeniesienie supernatantu z hodowli komórkowej do probówki wirowniczej typu Falcon. Następnie dodawano 2 cm³ 0,25% roztworu trypsyny do naczynia hodowlanego. Po upływie około 90 sekund weryfikowano proces trypsynizacji monowarstwy z wykorzystaniem mikroskopu o odwróconej optyce. Do komórek dodawano 8 cm³ pobranego wcześniej supernatantu celem inaktywacji trypsyny i kilkakrotnie przemywano zawieszoną powierzchnię adhezyjną naczynia hodowlanego. Następnie, przez około minutę, pipetowano zawiesinę w celu rozbicia agregatów komórek. Zawiesinę przenoszono do probówki wirowniczej zawierającej resztę supernatantu i wirowano przez 10 minut przy prędkości 100 × g w temperaturze pokojowej. Supernatant usuwano a osad komórkowy zawieszano w 10 cm³ świeżej pożywki hodowlanej. Do nowych naczyń przenoszono około 3,5 cm³ zawiesiny komórek i dopełniano do 20 cm³ pożywką.

Komórki raka wątrobowokomórkowego linii HepG2 hodowano w pożywce DMEM (Gibco) nr. kat. 12320032 o zawartości glukozy 1 g/dm³ i suplementowanej 10% FBS. Pasaż przeprowadzano analogicznie do procedury opisanej dla linii SH-SY5Y, z tą różnicą, że do nowych naczyń hodowlanych przenoszono około 2 cm³ zawiesiny komórek i dopełniano do 10 cm³ pożywką.

Całkowita zdolność antyoksydacyjna ergotioneiny (EGT) w testach *in vitro*

Odczynniki wykorzystywane w doświadczeniu: troloks (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy), askorbinian sodu (AA), kwas moczowy (UA), glutation w formie zredukowanej (GSH) i L-cysteina (L-C) były jakości cz.d.a. Wszystkie roztwory niezbędne do wykonania doświadczenia wykonywano w 100 mmol/dm³ buforze fosforanowym (Na/Na) o pH 7,4. Troloks i kwas moczowy rozpuszczano w buforze fosforanowym z dodatkiem wodorotlenku sodu w celu alkalizacji środowiska.

Do przygotowania roztworu troloksu o stężeniu $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ na każde 990 mm^3 buforu fosforanowego dodawano 10 mm^3 roztworu NaOH o stężeniu $1 \text{ mol}/\text{dm}^3$ (do końcowego stężenia NaOH w roztworze wynoszącego $10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$). Do sporządzenia roztworu kwasu moczowego o stężeniu $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ na każde 980 mm^3 buforu fosforanowego dodawano 20 mm^3 roztworu NaOH o stężeniu $1 \text{ mol}/\text{dm}^3$ (do końcowego stężenia NaOH w roztworze wynoszącego $20 \text{ mmol}/\text{dm}^3$). NaOH w roztworach antyoksydantów nie miał wpływu na wyniki przeprowadzanych testów lub ich przebieg.

Do doświadczenia wybrano oksydanty różne pod względem struktury i mechanizmu działania: nadtlenek wodoru (H_2O_2), dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny) (AAPH), wodoronadtlenek tert-butylu (TBOOH), dichromian potasu ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Roztwory antyoksydantów oraz oksydantów sporządzano w dniu eksperymentu. Pomiar wykonywano z wykorzystaniem czytnika mikroplętek termostатовanego do 37°C . Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych substancji przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch testów o różnej zasadzie działania.

Pomiar zdolności antyoksydacyjnej równoważników troloksu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; TEAC) [84] wykonywano na okrągłodennych, przezroczystych płytkach 96-dołkowych dedykowanych do pomiarów absorpcyjometrycznych (Greiner BioOne). Jako pierwszą metodę pomiaru całkowitej zdolności antyoksydacyjnej EGT wykorzystano metodę redukcji kationorodnika $\text{ABTS}^{\bullet-}$. Reakcja redukcji $\text{ABTS}^{\bullet-}$ skutkuje utratą barwy roztworu, umożliwiając kolorymetryczny pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej. Przed wykonaniem właściwego doświadczenia sporządzono roztwór nadsiarczanu potasu $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ o stężeniu $140 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ w wodzie MilliQ oraz roztwór ABTS o stężeniu $7 \text{ mmol}/\text{dm}^3$. Następnie 88 mm^3 roztworu nadsiarczanu potasu dodano do 5 cm^3 roztworu ABTS i po wymieszaniu na wortexie pozostawiono na 12 godzin w 4°C . Po upływie czasu inkubacji roztwór rozporcjowano do probówek typu Eppendorf i przechowywano w -80°C do ponownego wykorzystania. Roztwory wszystkich substancji badanych zawsze przygotowywano tuż przed eksperymentem i przechowywano nie dłużej niż kilka godzin na łaźni lodowej. Krzywą wzorcową troloksu przygotowywano równoległe do każdego doświadczenia.

W dniu eksperymentu roztwór ABTS rozcieńczano w proporcji 1:88 buforem fosforanowym. Roztwory antyoksydantów w odpowiednich stężeniach dodawano na ściankę dołka w objętości 1 mm^3 , zaś roztwory oksydantów w tej samej objętości na przeciwległą ściankę w stężeniu odpowiednim do uzyskania końcowego stężenia $40 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Powyższą procedurę stosowano w celu uniknięcia przedwczesnego

wymieszania się roztworów związku antyoksydacyjnego i oksydacyjnego. Bezpośrednio przed pomiarem, za pomocą 96-kanałowego systemu pipetującego Rainin Liquidator (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA), do dołków płytki reakcyjnej dodawano 100 mm³ rozcieńczonego roztworu ABTS i bezzwłocznie rozpoczynano pomiar absorbancji przy długości fali równej 734 nm. Pomiar powtarzano jeszcze dwukrotnie, po upływie 30 minut i 60 minut od dodania roztworu ABTS. Wyniki przedstawiono w postaci równoważników troloksu [$\mu\text{mol TE}/\text{cm}^3$; TE – trolox equivalents] określających zdolność antyoksydacyjną 1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ danego związku jako stężenie troloksu o równoważnościowym działaniu przeciwutleniającym.

Zasada działania testu FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) oparta jest o reakcję redukcji jonu żelazowego Fe^{3+} do jonu żelazawego Fe^{2+} katalizowaną przez badaną substancję [85]. W celu przygotowania roztworu roboczego do doświadczenia sporządzono bufor octanowy o stężeniu 300 mmol/dm³ (pH = 3,6), kwasowy roztwór 2,4,6-tris(2-pirydylo)-s-triazyny o stężeniu 10 mmol/dm³ w 40 mmol/dm³ kwasie solnym, oraz chlorek żelaza (III) o stężeniu 20 mmol/dm³. Bufor roboczy przygotowywano przed oznaczeniem poprzez wymieszanie powyższych roztworów w proporcjach 10:1:1 i podgrzewano do temperatury 37°C. Roztwory antyoksydantów oraz oksydantów dodawano do dołków płytki 96-dołkowej w sposób analogiczny do doświadczenia ABTS w objętości 2,5 mm³. Następnie 150 mm³ buforu roboczego dodawano do każdego z dołków i niezwłocznie rozpoczynano pomiar absorbancji przy długości fali równej 593 nm. Pomiar powtarzano po upływie 30 i 60 minut od dodania buforu roboczego do próbek.

Ocena przeżywalności komórek linii SH-SY5Y i HepG2 traktowanych ergotioneiną i innymi związkami

Pomiar przeżywalności komórek linii SH-SY5Y przeprowadzano metodą redukcji niefluorescencyjnej resazury do fluorescencyjnej rezorufiny [86]. Do doświadczenia komórki inokulowano na czarne, płaskodenne płytki 96-dołkowe (Nunc, Thermo Fisher Scientific) w ilości $1,5 \times 10^4$ komórek/dołek w 100 mm³ pełnej pożywki hodowlanej. Komórki pozostawiano w warunkach standardowych na 24 godziny.

W zależności od przeprowadzanego doświadczenia, dodawano 50 mm³ trzykrotnie stężonego roztworu ergotioneiny (24-rogodzinna preinkubacja komórek) lub 50 mm³ pełnej pożywki hodowlanej. Inkubację ze związkiem badanym przeprowadzano dodając czterokrotnie stężony roztwór związku badanego w objętości 50 mm³ na 24 godziny (lub inny, opisany w omówieniu wyników). Po zakończeniu inkubacji z dołków płytki

hodowlanej usuwano poprzez aspirację medium kondycjonowane i jednokrotnie przepłukiwano komórki roztworem PBS w celu usunięcia resztek pożywki. Do monowarstwy komórek dodawano 100 mm³ roztworu resazuryny (0,03 mg/cm³) w PBS i pozostawiano w warunkach standardowych na 150 minut. Następnie mierzono natężenie fluorescencji próbek z wykorzystaniem czytnika płytek używając zestawu filtrów Ex/Em 560/590 nm.

Przeżywalność komórek linii HepG2 sprawdzono metodą akumulacji czerwieni obojętnej [87]. Do doświadczenia komórki wysiewano na przezroczyste, płaskodenne płytki 96-dołkowe w ilości 1 × 10⁴ komórek/dołek w 100 mm³ pełnej pożywki hodowlanej. Komórki pozostawiano w warunkach standardowych na 24 godziny. Następnie, w zależności od przeprowadzanego doświadczenia, dodawano 50 mm³ trzykrotnie stężonego roztworu ergotioneiny (24-rogodzinna preinkubacja komórek) lub 50 mm³ pełnej pożywki a następnie po ukończeniu preinkubacji czterokrotnie stężony roztwór związku badanego na 24 godziny (a także 4 i 72 godziny). Po zakończeniu inkubacji do hodowli dodawano 20 mm³ 11-razy stężonego roztworu czerwieni obojętnej w PBS (stężenie końcowe w dołku 50 µg/cm³) i pozostawiano w warunkach standardowych na cztery godziny. Następnie usuwano supernatant z dołków i usuwano resztki barwnika poprzez trzykrotne, delikatne płukanie monowarstwy komórek roztworem PBS. Barwnik z komórek uwalniano dodając 150 mm³ roztworu solubilizującego (174,8 mmol/dm³ kwasu octowego, 8,3 mol/dm³ alkoholu etylowego) do dołków płytki hodowlanej. Po upływie 15 minut mierzono absorbancję próbek przy długości fali równej 540 nm.

Pomiar generacji reaktywnych form tlenu i azotu

Pomiar generacji reaktywnych form tlenu przeprowadzono z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych: H₂DCF-DA (dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny) [88], DHE (dihydroetydyna) [89], DHR123 (dihydrorodamina 123) [88], MitoSOX, DAF-FM-DA (dioctan 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny) [90]. Do eksperymentu komórki inokulowano na czarnych płytkach 96-dołkowych w sposób analogiczny do opisanego w podrozdziale 3.3. Komórki preinkubowano z ergotioneiną przez 24 godziny a następnie dodawano związki powodujące wystąpienie stresu oksydacyjnego. Po zakończeniu inkubacji z dołków usuwano supernatant, monowarstwę komórek jednokrotnie przepłukiwano roztworem PBS. Następnie do każdego z dołków dodawano 100 mm³ roztworu sondy w PBS o następującym stężeniu: H₂DCF-DA – 10 µmol/dm³, DHE – 10 µmol/dm³, DHR123 – 5 µmol/dm³, MitoSOX – 5 µmol/dm³,

DAF-FM – 1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Komórki pozostawiano na 30 minut w warunkach standardowych. Po upływie czasu inkubacji sondy usuwano poprzez aspirację a monowarstwę komórek jednokrotnie przemywano roztworem PBS w celu pozbycia się nadmiaru sondy w dołku i pozostawiano w 100 mm^3 roztworu PBS na czas pomiaru. Punktowych pomiarów fluorescencji dokonywano przy następujących długościach fali wzbudzenia/emisji: H₂DCF-DA – 485/535 nm, DHE – 520/590 nm, DHR123 – 485/535 nm, MitoSOX – 510/580 nm, DAF-FM – 495/515 nm.

Ocena wpływu ergotioneiny i LPS na rozkład faz cyklu komórkowego w komórkach linii HepG2

Komórki inokulowano na płycie 6-dołkowej w ilości $7,5 \times 10^5$ /dołek w objętości 3 cm^3 pełnej pożywki i pozostawiano w warunkach standardowych na 24 godziny. Następnie do hodowli dodawano roztwór ergotioneiny w stężeniu i objętości prowadzącym do uzyskania końcowego stężenia równego 25 lub 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Po upływie 24 godzin inkubacji do hodowli dodano wodny roztwór lipopolisacharydu (cząsteczka O127:B8 z *Escherichia coli*; Sigma Aldrich) do stężenia końcowego 100 ng/cm^3 na 24 godziny. Kolejno po usunięciu medium kondycjonowanego do monowarstwy komórek dodano 200 mm^3 0,25% roztworu trypsyny celem oderwania komórek od naczynia hodowlanego. Gdy wszystkie komórki uległy uwolnieniu od podłoża, do dołków dodawano 800 mm^3 roztworu PBS i rozbijano agregaty komórkowe poprzez wielokrotne pipetowanie. Następnie próbki przenoszono do probówek typu Eppendorf i wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut przy $100 \times g$. Supernatant usuwano a osad zawieszano w 100 mm^3 schłodzonego roztworu PBS i wstrzykiwano zdecydowanym ruchem pod powierzchnię schłodzonego uprzednio do -20°C 70% alkoholu etylowego, jednocześnie worteksując. Utrwalone w etanolu komórki odwirowywano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy $3000 \times g$. Następnie osad zawieszano w schłodzonym PBS i wirowano jak wcześniej w celu odplukania resztek alkoholu etylowego. Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w roztworze jodku propidyny (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) o stężeniu 75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ z dodatkiem 50 jednostek/ cm^3 RNAzy A w PBS [91]. Próbki inkubowano przez 30 minut w ciemności w temperaturze 37°C . Następnie próbki przenoszono do łaźni lodowej i wykonywano pomiar cytofluorymetryczny. Analizę wyników wykonano za pomocą oprogramowania FlowJo i GraphPad Prism 9.1.

Ocena wpływu ergotioneiny na indukcję procesu apoptozy

Komórki linii SH-SY5Y wysiewano w ilości $0,25 \times 10^6$ komórek/dołek na płytce 6-dołkowej w końcowej objętości pełnej pożywki hodowlanej równej 3 cm^3 . Hodowlę pozostawiano na noc w warunkach standardowych. Następnie komórki poddawano preinkubacji z roztworem ergotioneiny w stężeniu końcowym $75 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny. Po upływie czasu preinkubacji do komórek dodawano roztwory nadtlenu wodoru, AAPH, DETA NONOate i soli sodowej wodorosiarczynu menadionu do końcowych stężeń kolejno: $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $500 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $250 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ na 24 godziny. Następnie medium kondycjonowane usuwano i do dołków dodawano $1,5 \text{ cm}^3$ roztworu PBS zawierającego barwnik Hoechst 33342 o stężeniu $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ($17,8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i jodek propidyny (PI) w stężeniu $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ($15 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Komórki inkubowano przez 15 minut w warunkach standardowych, po czym wykonywano zdjęcia za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse Ti-U z użyciem filtrów DAPI oraz PI przy 40-krotnym powiększeniu obrazu. Nałożenie obrazów komórek z kanału dla jodku propidyny oraz Hoechst 33342 zostało wykonane za pomocą programu ImageJ. Analiza zdjęć została wykonana za pomocą oprogramowania CellProfiler 4.0 [92] i na podstawie kodu programu automatyzującego analizę zdjęć dostępnego na stronie twórców oprogramowania. Dyskryminacja komórek od resztek komórek dla poszczególnych linii komórkowych została wystandaryzowana na podstawie danych empirycznych. Uzyskane wartości względnej wartości fluorescencji dla PI/H33342 zostały zestawione za pomocą oprogramowania Microsoft Excel. Wartości graniczne pozwalające przypisać komórki do odpowiednich grup (prawidłowe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne, nekrotyczne) optymalizowano eksperymentalnie dla każdej linii komórkowej. Wyniki przedstawiono jako procent komórek przypisanej do danej grupy. Wyniki zestawiono w GraphPad Prism 9.5.

Pomiar wpływu lipopolisacharydu i ergotioneiny na poziom metalotionein w komórkach linii HepG2

Ilościowe oznaczenie metalotionein przeprowadzano za pomocą metody opierającej się o odczynnik Ellmana [93]. Do wykonania doświadczenia $7,5 \times 10^5$ komórek/dołek wysiewano na 6-dołkowej płytce hodowlanej w 3 cm^3 pełnej pożywki hodowlanej/dołek. Następnego dnia do komórek dodawano roztwór ergotioneiny do końcowego stężenia 25 i $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i preinkubowano przez 24 godziny. Po preinkubacji do hodowli dodawano wodny roztwór lipopolisacharydu do końcowej zawartości równej $100 \text{ ng}/\text{dm}^3$ i inkubowano

przez 24 godziny w warunkach standardowych. Następnie komórki trypsynizowano zgodnie ze standardową procedurą i wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy prędkości $100 \times g$. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 250 mm^3 buforu do sonikacji ($0,5 \text{ mol/dm}^3$ sacharozy, 20 mmol/dm^3 Tris-HCl pH = 8,6, 0,01% (o/o) 2-merkaptoetanol). Probówkę z zawiesiną komórkową umieszczano na lodzie i sonikowano przez 120 sekund, przy 50% pulsacji i mocy równej $80 \text{ J} \times \text{s}^{-1}$. Komórki wirowano następnie przez 30 minut przy $16000 \times g$ w temperaturze 4°C . Supernatant przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf.

30 mm^3 supernatantu przeznaczano na oznaczenie zawartości białka w próbce za pomocą odczynnika przeznaczonego do pomiaru stężenia białka w buforach lizujących zawierających detergenty (Pierce Detergent Compatible Bradford Reagent). Pomiar przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta. Do 10 mm^3 próbki białka rozcieńczonej dwu-, pięcio- i dziesięciokrotnie (w trzech powtórzeniach) dodawano 300 mm^3 odczynnika do pomiaru stężenia białka. Sporządzano również stężeniową krzywą kalibracyjną na bazie surowiczej albuminy wołowej. Próby inkubowano przez pięć minut w temperaturze pokojowej w zaciemnionym miejscu. Mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali równej 595 nm. Zawartość białka w próbce przeliczano na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej w granicach detekcji odczynnika ($2 - 1500 \mu\text{g/cm}^3$).

Następnie do 200 mm^3 supernatantu dodawano 210 mm^3 schłodzonego do -20°C bezwodnego (99,99%) alkoholu etylowego i inkubowano co najmniej jedną godzinę w temperaturze -20°C . Mieszaninę wirowano przez 10 minut przy $6000 \times g$ w temperaturze 4°C . Supernatant usuwano, a osad przemywano jednokrotnie za pomocą mieszaniny etanol:chloroform:bufor do sonikacji (w stosunku objętościowym 81:1:12) poprzez delikatne worteksowanie i pipetowanie próby. Próbki odparowywano do sucha za pomocą wyparki próżniowej w temperaturze -4°C i zawieszano w 150 mm^3 buforu reakcyjnego (5 mmol/dm^3 Tris-HCl pH = 7,5, 1 mmol/dm^3 EDTA). Następnie do przezroczystej, 96-dołkowej płytki płaskodennej dodawano 280 mm^3 $0,43 \text{ mmol/dm}^3$ odczynnika Ellmana w 200 mmol/dm^3 buforze potasowo-fosforanowym pH = 8,0 i 20 mm^3 próby badanej. Próbki inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, następnie zmierzono absorbancję przy $\lambda = 412 \text{ nm}$. Wyniki doświadczenia przeliczono na krzywą wzorcową wykonaną ze zredukowanego glutationu i znormalizowano na miligram białka w próbce (przy założeniu, że 1 mol metalotionein posiada 20 moli reszt cysteinowych).

Ocena modulacji autofagii przez EGT

Autofagię w komórkach oceniono z wykorzystaniem barwnika monodansylokadaweryny (MDC) [94] na podstawie protokołu według Vazquez i Colombo z odpowiednimi modyfikacjami [95]. Po inkubacji ze związkami badanymi do komórek dodano stężony roztwór MDC w PBS (końcowe stężenie $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C . Komórki przepłukano jednokrotnie za pomocą PBS i zlizowano celem uwolnienia MDC za pomocą buforu lizującego ($10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ Tris-HCl, $\text{pH} = 8$, Triton X-100 $0,1\%$ (v/v)) w objętości końcowej 100 mm^3 na dołek. Pomiaru fluorescencji MDC dokonano dla wartości ekscytacji/emisji wynoszących odpowiednio 365 oraz 525 nm. Normalizacji sygnału dokonano poprzez ocenę ilości DNA w lizacie za pomocą jodku propidyny (w stężeniu końcowym $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Pomiaru dla jodku propidyny dokonano dla wartości ekscytacji/emisji wynoszących odpowiednio 535 oraz 615 nm.

Ocena aktywności wybranych transporterów z rodziny ABC

Wszystkie poniższe doświadczenia związane z oceną aktywności transporterów ABC rozpoczynano w następujący sposób: komórki wysiewano w naczyniach hodowlanych o nominalnej powierzchni 25 cm^2 w ilości 2×10^6 komórek w 5 cm^3 pełnej pożywki hodowlanej. Do wykonania jednego powtórzenia tego doświadczenia wysiewano co najmniej trzy takie naczynia hodowlane (próby: komórki kontrolne, komórki inkubowane z ergotioneiną w stężeniu $25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, komórki inkubowane z ergotioneiną w stężeniu $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Następnego dnia do hodowli dodawano 1 cm^3 roztworu ergotioneiny w stężeniu odpowiednim do otrzymania końcowego stężenia równego kolejno $25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Komórki pozostawiano na 24 godziny w warunkach standardowych. Po upływie czasu inkubacji usuwano supernatant a monowarstwę komórek przemywano jednokrotnie roztworem PBS niezawierającym jonów wapnia i magnezu. Komórki uwalniano od podłoża dodając 1 cm^3 $0,25\%$ roztworu trypsyny. Następnie dodawano 4 cm^3 pełnej pożywki hodowlanej w celu neutralizacji trypsyny i wielokrotnie pipetowano pipetą serologiczną o pojemności 10 cm^3 . Komórki przenoszono do probówek typu Falcon o pojemności 15 cm^3 i wirowano przez 10 minut przy $100 \times g$ w temperaturze pokojowej. Supernatant usuwano poprzez aspirację a osad zawieszano w 2 cm^3 pełnej pożywki hodowlanej. Zawiesiny komórek przenoszono do probówek i inkubowano w 37°C .

Pomiar aktywności transporterów ABCB1 z użyciem kalceiny

Każdą z próbek dzielono na dwie równe części po 1 cm³ każda i przenoszono do osobnych probówek. Kontrolę pozytywną inhibicji transportera ABCB1 uzyskiwano poprzez dodanie do jednego zestawu próbek roztworu werapamilu. Tak więc do pierwszego zestawu niezawierającego inhibitora dodawano 1 cm³ pełnej pożywki hodowlanej zawierającej ester acetoksymetylowy kalceiny w stężeniu 40 nmol/dm³ (końcowe stężenie w probówce równe 20 nmol/dm³), podczas gdy do zestawu będącego pozytywną próbą kontrolną dodawano 1 cm³ pełnej pożywki zawierającej ester acetoksymetylowy kalceiny w stężeniu 40 nmol/dm³ oraz werapamil w stężeniu 50 μmol/dm³ [96]. Niezwłocznie po dodaniu barwnika (lub barwnika z inhibitorem) zawiesinę mieszano poprzez worteksowanie i rozpoczynano pomiar, każdorazowo rejestrując 10000 zdarzeń. Pomiar wykonywano co 2 minuty aż do osiągnięcia wysycenia próbek barwnikiem.

Pomiar aktywności transportera ABCC1 z użyciem Fluo-3

Każdą z próbek dzielono na dwie równe części po 1 cm³ każda i przenoszono do osobnych probówek pomiarowych. Kontrolę pozytywną inhibicji transportera ABCC1 uzyskiwano poprzez dodanie do jednego zestawu próbek roztworu MK571. Tak więc do pierwszego zestawu niezawierającego inhibitora dodawano 1 cm³ pełnej pożywki hodowlanej zawierającej ester acetoksymetylowy Fluo-3 w stężeniu 2 μmol/dm³ (końcowe stężenie w probówce równe 1 μmol/dm³), podczas gdy do zestawu będącego pozytywną próbą kontrolną dodawano 1 cm³ pełnej pożywki zawierającej ester acetoksymetylowy Fluo-3 w stężeniu 2 μmol/dm³ i inhibitor MK571 w stężeniu 50 μmol/dm³ [97]. Niezwłocznie po dodaniu barwnika (lub barwnika z inhibitorem) zawiesinę mieszano poprzez worteksowanie i rozpoczynano pomiar na wysokiej prędkości przepływu, każdorazowo rejestrując 10000 zdarzeń. Pomiar wykonywano co 5 minut aż do rozładowania komórek z cząsteczek barwnika.

Pomiar aktywności transportera ABCC1 z użyciem BCECF-AM

Do każdej z prób dodawano 1 cm³ trzykrotnie stężonego roztworu BCECF-AM (900 nmol/dm³; końcowe stężenie w probówce równe 300 nmol/dm³) na czas 3 minut w 37°C [98]. Następnie próbki niezwłocznie umieszczano na lodzie i wirowano przez 10 minut w 4°C przy 100 × g. Po zakończeniu wirowania próbki przenoszono na lód i usuwano supernatant. Do każdej z probówek dodawano 2 cm³ zimnej pełnej pożywki i zawieszano osad poprzez wielokrotne pipetowanie. Każdą z próbek dzielono na dwie

równe części po 1 cm³ każda i przenoszono do osobnych probówek pomiarowych. Kontrolę pozytywną inhibicji transportera ABCC1 uzyskiwano poprzez dodanie do jednego zestawu próbek roztworu MK571. Tak więc do pierwszego zestawu niezawierającego inhibitora dodawano 1 cm³ pełnej pożywki hodowlanej ogrzanej do 37°C, podczas gdy do zestawu będącego pozytywną próbą kontrolną dodawano 1 cm³ pełnej pożywki hodowlanej ogrzanej do 37°C zawierającej inhibitor MK571 w stężeniu 50 μmol/dm³. Niezwłocznie po dodaniu ogrzanej pożywki zawiesinę mieszano poprzez worteksowanie i rozpoczynano pomiar na wysokiej prędkości przepływu, każdorazowo rejestrując 10000 zdarzeń w populacji czwartej. Pomiar wykonywano co 10 minut aż do rozładowania komórek z cząsteczek barwnika. Pomiędzy pomiarami próbki inkubowano w 37°C.

Analiza ekspresji wybranych genów w komórkach HepG2 metodą qPCR

Modulację ekspresji genów oznaczono metodą Real-Time qPCR. W tym celu z komórek HepG2 wyizolowano całkowite RNA, które następnie przepisano na drodze reakcji odwrotnej transkrypcji, aby otrzymać cDNA. Do izolacji RNA z hodowli komórkowej wykorzystano zestaw do kolumnkowej izolacji całkowitego RNA z komórek eukariotycznych (Syngen, Wrocław, Polska). Komórki inokulowano w ilości $7,5 \times 10^5$ w 3 cm³ pełnej pożywki hodowlanej/dołek na 6-dołkowych płytkach hodowlanych. Następnego dnia do komórek dodawano roztwór ergotioneiny do końcowego stężenia 25 i 50 μmol/dm³ w dołku i pozostawiano w warunkach standardowych na 24 godziny. Procedurę lizy komórek rozpoczynano poprzez usunięcie medium kondycjonowanego z nadmonowarstwy i jednokrotne przepłukanie roztworem PBS. Do dołków dodawano 200 mm³ 0,25% roztworu trypsyny i pozostawiano w warunkach standardowych do czasu odpadnięcia komórek od podłoża naczynia. Następnie dodawano po 800 mm³/dołek roztworu PBS i pipetowano wielokrotnie. Próbkę wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy 100 × g. Supernatant usuwano a osad zawieszano w 350 mm³ buforu lizującego z 1% zawartością 2-merkaptoetanolu i intensywnie worteksowano. Próbkę inkubowano przez pięć minut w temperaturze pokojowej w celu poprawnej lizy komórek. Lizaty nanoszono na kolumnienki i wirowano przez 2 minuty przy 10000 × g w 4°C (od tego momentu całą preparatykę wykonywano w łaźni lodowej). Kolumnienki usuwano a przesącz mieszało z jedną objętością schłodzonego do 4°C 70% etanolu i mieszało poprzez kilkukrotne pipetowanie. Następnie całość przenoszono na kolumnienki wiążące i wirowano przez 1 minutę w 4°C przy 10000 × g. Przesącz usuwano a kolumnienkę płukano dwukrotnie 250 mm³ buforu RP1 a następnie dwukrotnie stosując

700 mm³ buforu RP2. Wszystkie płukania wykonywano w ten sam sposób, tj. наносono odpowiedni bufor na złoże kolumnienki i wirowano próbki przez 1 minutę w 4°C przy 10000 × g. Po zakończeniu procedury płukania suszono kolumnienki poprzez wirowanie przy 10000 × g w 4°C przez 3 minuty. Elucję RNA przeprowadzano poprzez nałożenie bezpośrednio na złoże 40 mm³ wody wolnej od RNAz i wirowanie przez 2 minuty przy 10000 × g. Parametry jakościowe RNA ustalano za pomocą aparatu Nanodrop (ThermoFisher Scientific) poprzez pomiar absorpcji próby przy $\lambda = 260$ nm oraz pomiar parametrów 230/260 i 260/280. Poporcjowane próby przechowywano w -80°C do momentu wykonania doświadczenia.

Wyizolowany materiał RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoFisher Scientific). Mieszaninę reakcyjną sporządzano w następujący sposób: na każde 2 µg całkowitego RNA dodawano 4 mm³ buforu reakcyjnego, 2 mm³ roztworu odwrotnej transkryptazy i dopełniano wodą wolną od RNAz do objętości końcowej 20 mm³. Próbkę inkubowano kolejno: 10 minut w 25°C, 30 minut w 60°C i 5 minut w 85°C. Gotowe cDNA rozcieńczano ośmiokrotnie wodą wolną od DNAz i przechowywano analogicznie do materiału DNA do czasu oznaczeń.

Reakcję qPCR przeprowadzano za pomocą dostępnych komercyjnie 96-dołkowych płytek reakcyjnych ABC Transporter Panel (Roche, Bazylea, Szwajcaria) zawierających 84 zestawy starterów do pomiaru liczby kopii mRNA kodującego wybrane transportery ABC. Analizę ekspresji transportera SLC22A4 oparto o startery przygotowane na zamówienie przez firmę Genomed (Warszawa, Polska). Sekwencja starterów: forward 5'- GAATCTCCCCGATGGCTGAT-3', reverse 5'- TCAGGGGATTTAGCTCCTCCA-3'; długość produktu 133 bp. Sekwencję primerów przygotowano i zwalidowano za pomocą narzędzi PrimerBLAST i OligoAnalyzer 3.1. Wszystkie reakcje qPCR przeprowadzano za pomocą termocyklera C1000 Thermal Cycler z głowicą do pomiaru fluorescencji przystosowaną do płytek 96-dołkowych CFX96 Real-Time System (Bio-Rad).

Amplifikację cDNA z wykorzystaniem płytek ABC Transporter Panel przeprowadzano w dedykowanej do tego celu mieszaninie reakcyjnej LightCycler 480 Probes Master (Roche). Reakcję przeprowadzano w końcowej objętości równej 20 mm³, w skład której wchodziło 10 mm³ dwukrotnie stężonej mieszaniny reakcyjnej, 5 mm³ wody wolnej od DNAz i 5 mm³ matrycy cDNA. Protokół reakcyjny przebiegał następująco: jeden cykl trwający 10 minut w temperaturze 95°C, następnie 45 cykli po 10 sekund w temperaturze 95°C i 30 sekund w temperaturze 60°C (włącznie z pomiarem fluorescencji).

Reakcje qPCR mające na celu ocenę ekspresji genu kodującego białko SLC22A4 przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal (ThermoFisher Scientific). Do dołka płytki 96-dołkowej do reakcji qPCR dodawano 10 mm³ dwukrotnie stężonej mieszaniny reakcyjnej, 1,5 mm³ mieszaniny obu starterów (stężenie końcowe 0,3 μmol/dm³), 6,5 mm³ wody do PCR i 2 mm³ matrycy cDNA. Reakcję prowadzono według następujących ustawień: jeden cykl przez 2 minuty w temperaturze 50°C, jeden cykl przez 10 minut w temperaturze 95°C, 40 cykli po 15 sekund w temperaturze 95°C i 45 sekund w temperaturze 60°C (włącznie z pomiarem fluorescencji). Na koniec procesu amplifikacji wyznaczano krzywą topnienia w celu oznaczenia specyficzności powstającego produktu (zakres temp. 65°C - 95°C z pomiarem co 0,5°C).

Ocena poziomu wybranych białek w komórkach HepG2 i SH-SY5Y metodą western blot

W celu uzyskania lizatu białkowego z komórek linii HepG2 i SH-SY5Y inokulowano kolejno $7,5 \times 10^5$ i $1,0 \times 10^6$ komórek/dołek na 6-dołkowej płytce hodowlanej w 3 cm³ pełnej pożywki hodowlanej. Przeprowadzono preinkubację z ergotioneiną dodając do dołków 1 cm³ czterokrotnie stężonego roztworu ergotioneiny do uzyskania stężeń końcowych 25 i 50 μmol/dm³ dla komórek linii HepG2 lub stężeń końcowych 100 i 200 μmol/dm³ dla komórek linii SH-SY5Y. Po upływie 24 godzin preinkubacji komórki traktowano związkami badanymi. Po zakończeniu inkubacji komórki trypsynizowano dodając 200 mm³/dołek 0,25% roztworu trypsyny pozostawiając na około 10 minut w warunkach standardowych. Następnie do komórek dodawano 800 mm³/dołek schłodzonego do 4°C roztworu PBS zawierającego 1% inhibitorów proteaz (AEBSF, aprotynina, bestatyna, E-64, leupeptyna i pepstatyna A; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) i 1% inhibitorów fosfataz (kantarydyna, szczawian (-)-p-bromolewamizolu i kalikulina A; Sigma-Aldrich, Merck). Zawiesinę komórek pipetowano wielokrotnie. Próby przenoszono do probówek o pojemności 1,5 cm³ i wirowano przez 10 minut przy 100 × g w temperaturze pokojowej. Supernatant usuwano poprzez aspirację a osad zawieszano w 150 mm³ buforu lizującego M-PER (ThermoFisher Scientific) zawierającego 1% inhibitorów fosfataz i 1% inhibitorów proteaz. Próbkę worteksowano do rozbicia osadu komórkowego i wytrząsano przez 30 minut przy 1200 rpm w 4°C. Lizaty komórkowe następnie mrożono i przechowywano w -80°C aż do dnia eksperymentu.

Rozmrożone w łaźni lodowej próby wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 12000 × g w celu usunięcia pozostałości po lizie. Supernatant przenoszono do nowych

próbówek typu Eppendorf. Do rozdzielania elektroforetycznego przygotowywano mieszaninę zawierającą 20 µg całkowitego białka, 4 mm³ pięciokrotnie stężonego buforu obciążającego Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer (ThermoFisher Scientific), całość dopełniając do 20 mm³ buforem lizującym M-PER. Próbki dokładnie mieszano, a następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze 95°C w celu redukcji struktury białek. Po inkubacji próbki przechowywano w temperaturze pokojowej i po wystygnięciu nakładano na przygotowany żel. W zależności od dostępności elektroforezę prowadzono na żelach poliakrylamidowych przygotowanych w laboratorium bądź też komercyjnie dostępnych gradientowych żelach poliakrylamidowych (Bio-Rad). Procentowość żelu dobierano indywidualnie do zestawu testowanych białek (w zależności od ich masy oraz stopnia fosforylacji). Niezależnie od procentowości żelu do zewnętrznych rynienek zawsze nakładano kolorowy wzorec mas zgodnie z zaleceniami producenta (jeden z dwóch, w zależności od masy szukanego białka – Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad) lub SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Invitrogen, ThermoFisher Scientific)). Próby nakładano na żel w objętości 20 mm³/rynienkę. Elektroforezę prowadzono w buforze SDS-PAGE (25 mmol/dm³ Tris, 192 mmol/dm³ glicyny, 0,1% SDS, pH 8.3) pod napięciem 40 V przez 5 minut a następnie pod napięciem 120 V przez około 45 minut, aż do pełnego rozdzielania. Transfer z żelu na membranę PVDF Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad) przeprowadzano przy użyciu aparatu do elektrotransferu Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) a następnie membrany umieszczano w buforze blokującym na godzinę lub 30 minut w zależności od stosowanego buforu. W zależności od szukanych białek stosowano jeden z dwóch buforów blokujących: 5% roztwór odtłuszczonego krowiego mleka w proszku w TBST (20 mmol/dm³ Tris, 150 mmol/dm³ NaCl, 0.1% Tween 20) lub komercyjnie dostępny roztwór blokujący EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad) stosowany do ufosforylowanych form badanych białek. Po upływie czasu blokowania, membrany umieszczano w szalce z TBST i cięto skalpelem równoległe do wzorca mas w celu podzielenia membran. Zablockowane kawałki membrany umieszczano w buforach blokujących zawierających przeciwciała skierowane na szukane białka (Tab. 3). Rozcieńczenie przeciwciał dobierano na podstawie zaleceń producenta i metodą dot-blot. O ile nie zaznaczono inaczej, przeciwciała skierowane na białka badane stosowano w rozcieńczeniu 1:1000. Kawałki membran inkubowano przez noc na wytrząsarce orbitalnej w temperaturze pokojowej. Następnego dnia do kawałków membran dodawano przeciwciała skierowane na β-aktynę w rozcieńczeniu 1:10000 i inkubowano przez godzinę na wytrząsarce orbitalnej. Roztwory przeciwciał

usuwano a kawałki membran płukano w TBST czterokrotnie, kolejno przez 30 sekund, 5 minut, 10 minut i 15 minut, wymieniając roztwór TBST po każdym z płukań. Następnie membrany zawieszano w roztworze przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową (horseradish peroxidase; HRP). Stosowano przeciwciało antymysie (rozcieńczenie 1:10000) i anty-królicze (rozcieńczenie 1:60000) w zależności od użytych przeciwciał pierwszorzędowych. Membrany inkubowano przez godzinę a następnie płukano analogicznie jak wcześniej. Wizualizację chemiluminescencyjną membran przeprowadzono za pomocą aparatu UVITEC Cambridge Alliance HD4 Mini (Cambridge, Zjednoczone Królestwo Wielkiej Brytanii i Irlandii Północnej) po uprzedniej inkubacji membrany w roztworze wywołującym na bazie luminolu SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific). Analizę densytometrii przeprowadzono za pomocą oprogramowania dołączonego do aparatu do chemiluminescencji.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników

O ile nie wskazano inaczej, wyniki porównywano między sobą stosując test t-Studenta. Istotność statystyczną wyników oznaczano w następujący sposób: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Tabela 3. Wykaz przeciwciał wykorzystywanych w doświadczeniach. CST – Cell Signaling Technology; AB – Affinity Biosciences; r – królicze; m – mysie.

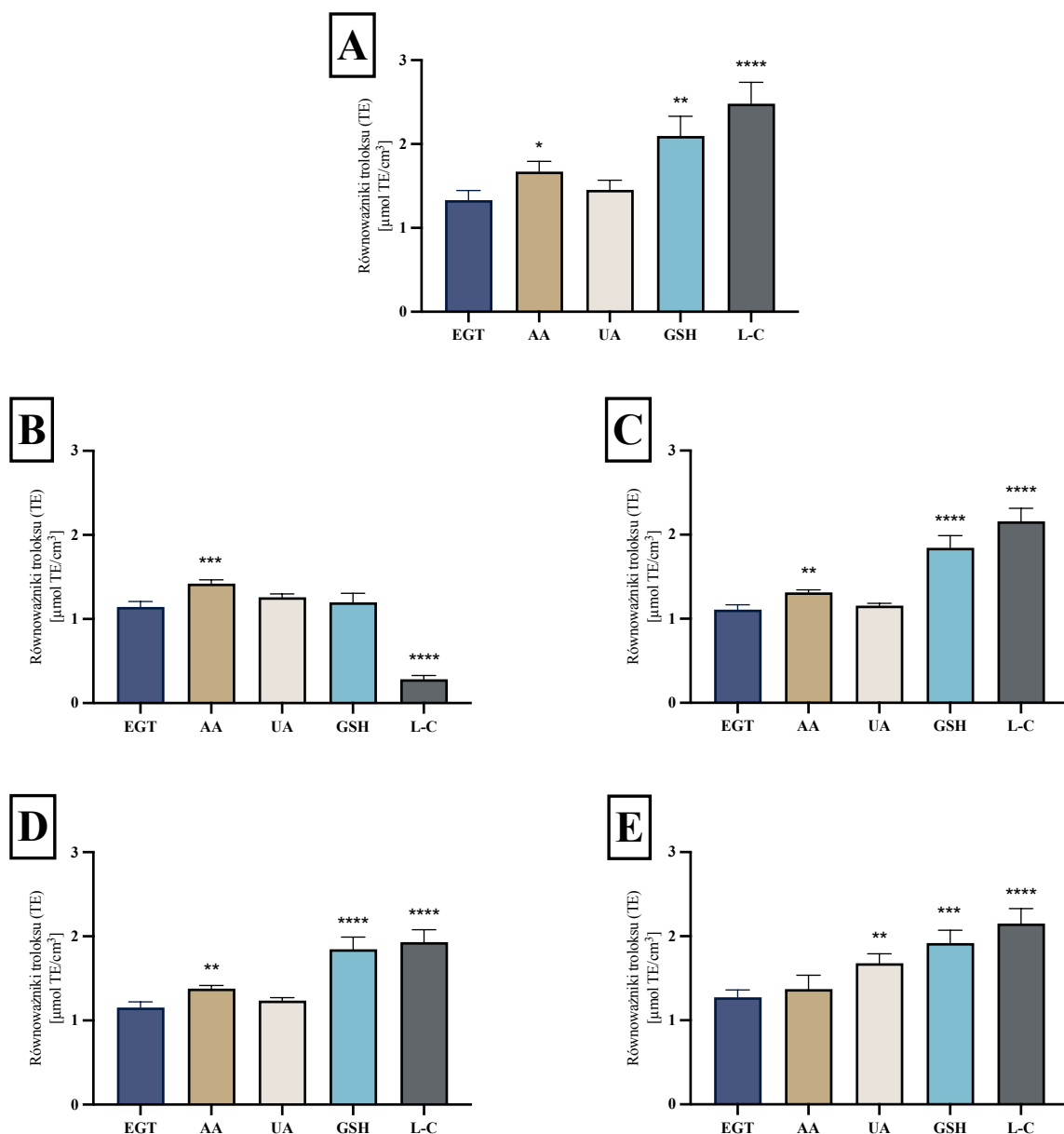
Antygen	Klon przeciwciała I° (producent)	Izotyp przeciwciała	Przeciwciało 2°
ZO1	D7D12 (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
ZEB1	D80D3 (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
E-kaderyna	24E10 (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
N-kaderyna	D4R1H (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
β-katenina	D10A8 (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
Klaudyna-1	D5H1D (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
Wimentyna	D21H3 (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
Snail	C15D3 (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
Slug	C19G7 (CST)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
Hsc70	AB_2837673 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
Cdk5	AB_2835215 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
GSK-3α	AB_2835192 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
LC3-A	AB_2835334 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
LC3-B	AB_2844592 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
mTOR	NP_004949 (biorbyt)	mIgG ₁	Królicze anti-mIgG ₁ koniugat z HRP
GSK3β	AB_2834935 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
p-GSK3β (Ser9)	AB_2834439 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
ULK1	AB_2841079 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
p-ULK1 (Ser758)	AB_2844452 (AB)	rIgG ₁	Kozie anti-rIgG ₁ koniugat z HRP
SLC22A4	NP_003050 (Novus)	mIgG ₁	Królicze anti-mIgG ₁ koniugat z HRP
ABCC1	QCRL-1 (Sigma)	mIgG ₁	Królicze anti-mIgG ₁ koniugat z HRP
ABCC2	CPR96 (Sigma)	mIgG ₁	Królicze anti-mIgG ₁ koniugat z HRP
β-aktyna	AC-74 (Sigma)	mIgG ₁	Królicze anti-mIgG ₁ koniugat z HRP

VI. Wyniki

W niniejszej części dysertacji przedstawiono empiryczne dowody wspierające tezę, że ergotioneina (EGT) w komórkach eukariotycznych pełni nie tylko funkcję antyoksydacyjną, ale również funkcję cząsteczki sygnałowej.

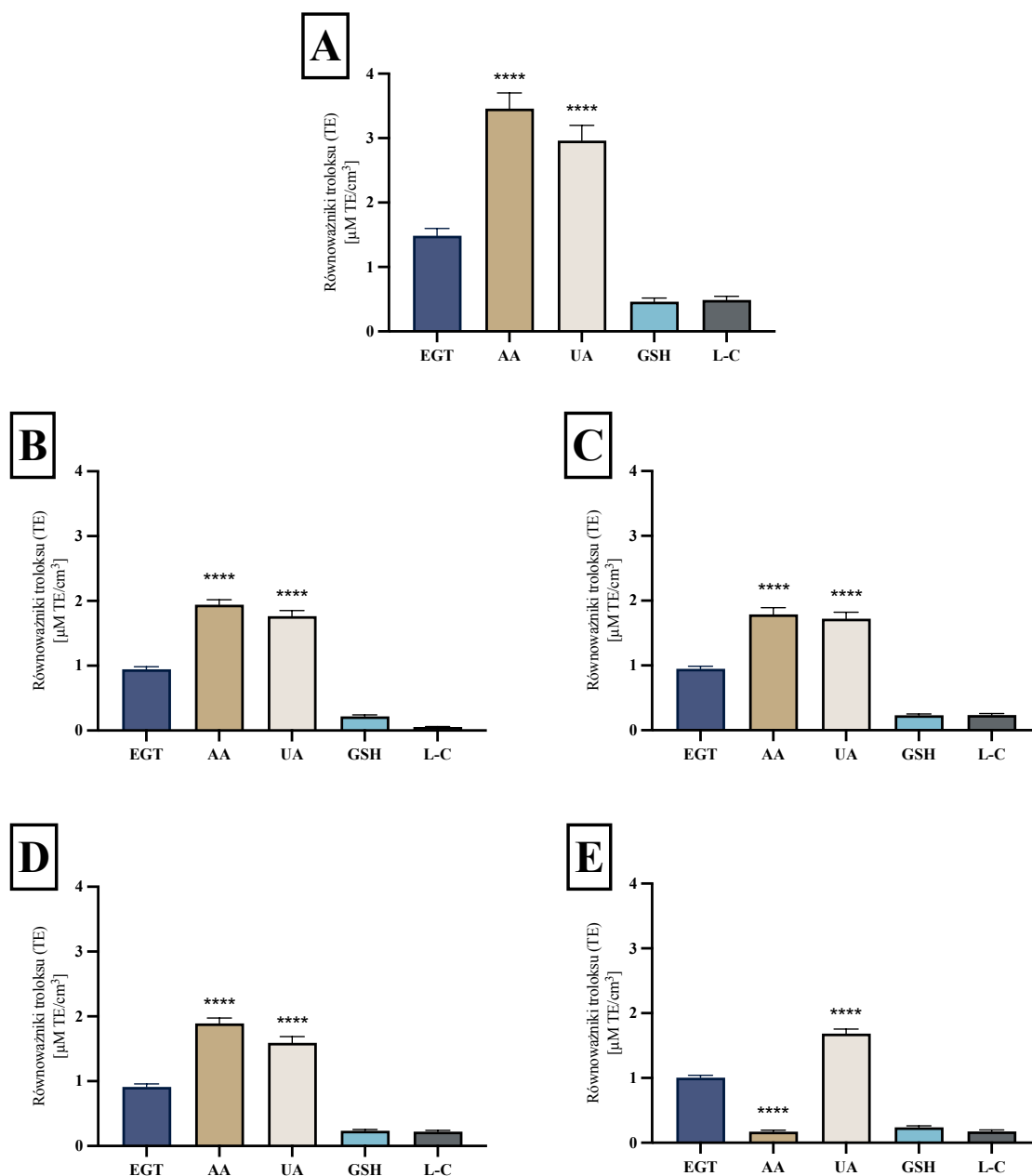
Pomiar całkowitej wydajności antyoksydacyjnej ergotioneiny *in vitro*

W celu oceny całkowitej zdolności antyoksydacyjnej EGT zastosowano dwie metody pomiarowe: metodę redukcji kationorodnika ABTS i metodę FRAP. Pomiar przeprowadzone metodą redukcji kationorodnika ABTS wykazały, że EGT jest porównywalnie efektywnym antyoksydantem co kwas moczowy (UA) ($p=0,46$), choć słabszym niż kwas askorbinowy (AA) ($p=0,05$) (Ryc. 3A). W porównaniu do glutationu (GSH) ($p=0,0044$) i L-cysteiny (L-C) ($p < 0,0001$), EGT jest mniej efektywnym antyoksydantem. L-C i GSH wydajnie przereagowały z nadtlakiem wodoru, co spowodowało obniżenie wartości TE dla L-C w teście o około 90% i GSH o około 40% (Ryc. 3B). Natomiast EGT nie wykazuje wysokiej reaktywności względem nadtlaku wodoru, przez co w obecności H_2O_2 równie skutecznie jak GSH zareagowała z kationorodnikiem ABTS. Zastosowanie w doświadczeniu AAPH, czyli generatora rodników nadtlakowych, nie powoduje znacznego spadku wartości pomiaru całkowitej zdolności antyoksydacyjnej badanych związków (Ryc. 3C). EGT nie wykazuje wysokiej reaktywności względem AAPH, osiągając wartości TE niższe od AA ($p=0,0025$), GSH ($p=0,0001$) i L-C ($p < 0,0001$). Podobnie prezentują się zależności pomiędzy antyoksydantami w obecności TBOOH (Ryc. 3D). Natomiast w obecności dichromianu potasu antyoksydanty UA ($p=0,0067$), GSH ($p=0,0005$) i L-C ($<0,0001$) reagują równie wydajnie co EGT, przez co ich wartości TE nie ulegają dużej zmianie. Z uwagi na specyficzną reakcję AA z dichromianem analiza statystyczna wykazała brak różnic pomiędzy EGT i AA. Dowodzi to, że EGT nie reaguje z dichromianem jak AA, co stanowi kolejną zaletę tego związku. EGT w fizjologicznym pH występuje głównie w strukturze tiomocznikowej. W środowisku o kwasowym pH równym 3,6 EGT była równie wydajnym antyoksydantem jak w teście opartym o redukcję kationorodnika ABTS (Ryc. 4A). Spośród wszystkich badanych substancji AA i UA wykazały najbardziej wydajne działanie antyoksydacyjne (Ryc. 4A). Wyniki pomiarów wartości TE dla AA ($p < 0,0001$) i UA ($p < 0,0001$) były kolejno około 2,5-krotnie i 2-krotnie większe od wartości uzyskanych przez EGT. Wszystkie badane substancje zareagowały z nadtlakiem wodoru, co spowodowało obniżenie wartości TE (Ryc. 4B).



Rycina 3. Całkowita zdolność antyoksydacyjna ergotioneiny i modelowych antyoksydantów zmierzona metodą redukcji kationorodnika ABTS. Wyniki wyrażono w równoważnikach troloksu (TE od Trolox Equivalents) w jednostce $\mu\text{mol TE}/\text{cm}^3$. Na wykresach przedstawiono kolejno (EGT) ergotioneinę, (AA) kwas askorbinowy, (UA) kwas moczowy, (GSH) glutation i (L-C) L-cysteinę. Doświadczenie przeprowadzono (A) bez dodatku związku utleniającego, (B) z $40 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{H}_2\text{O}_2$, (C) $40 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{AAPH}$, (D) $40 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{TBOOH}$, (E) $40 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Istotność statystyczną wyznaczono dla porównania średniej arytmetycznej wyników danego związku do średniej arytmetycznej wyników ergotioneiny. Wyniki wyrażono w postaci wartości średniej arytmetycznej $\pm \text{SD}$, $n = 3$.

W teście FRAP, ze względu na specyfikę testu, antyoksydanty AA i UA wykazały stosunkowo niższy wynik TE w obecności związku utleniającego niż w teście redukcji kationorodnika ABTS (Ryc. 3B).



Rycina 4. Całkowita zdolność antyoksydacyjna ergotioneiny i modelowych antyoksydantów zmierzona metodą FRAP. Wyniki wyrażono w równoważnikach troloksu (TE) w jednostce $\mu\text{mol TE/cm}^3$. Na wykresach przedstawiono kolejno (EGT) ergotioneinę, (AA) kwas askorbinowy, (UA) kwas moczowy, (GSH) glutation i (L-C) L-cysteinę. Doświadczenie przeprowadzono (A) bez dodatku związku utleniającego, (B) z $40 \mu\text{mol/dm}^3 \text{H}_2\text{O}_2$, (C) $40 \mu\text{mol/dm}^3 \text{AAPH}$, (D) $40 \mu\text{mol/dm}^3 \text{TBOOH}$, (E) $40 \mu\text{mol/dm}^3 \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Istotność statystyczną oznaczono dla porównania średniej arytmetycznej wyników danego związku do średniej arytmetycznej wyników ergotioneiny. Wyniki wyrażono w postaci średniej arytmetycznej wyników cząstkowych $\pm \text{SD}$, $n = 3$.

W obecności AAPH lub TBOOH badane związki (EGT, AA i UA) wykazują zbliżoną efektywność przeciwutleniającą co w przypadku zastosowania nadtlenu wodoru (Ryc. 4C-D). AA, podobnie jak w metodzie opartej o redukcję kationorodnika ABTS, w znacznej części uległ reakcji z jonami chromu i co za tym idzie w znacznie niższym

stopniu uległ reakcji redoks z jonami żelazowymi (Ryc. 4E). W przypadku EGT nie zaobserwowano istotnych zmian w zależności od środka utleniającego.

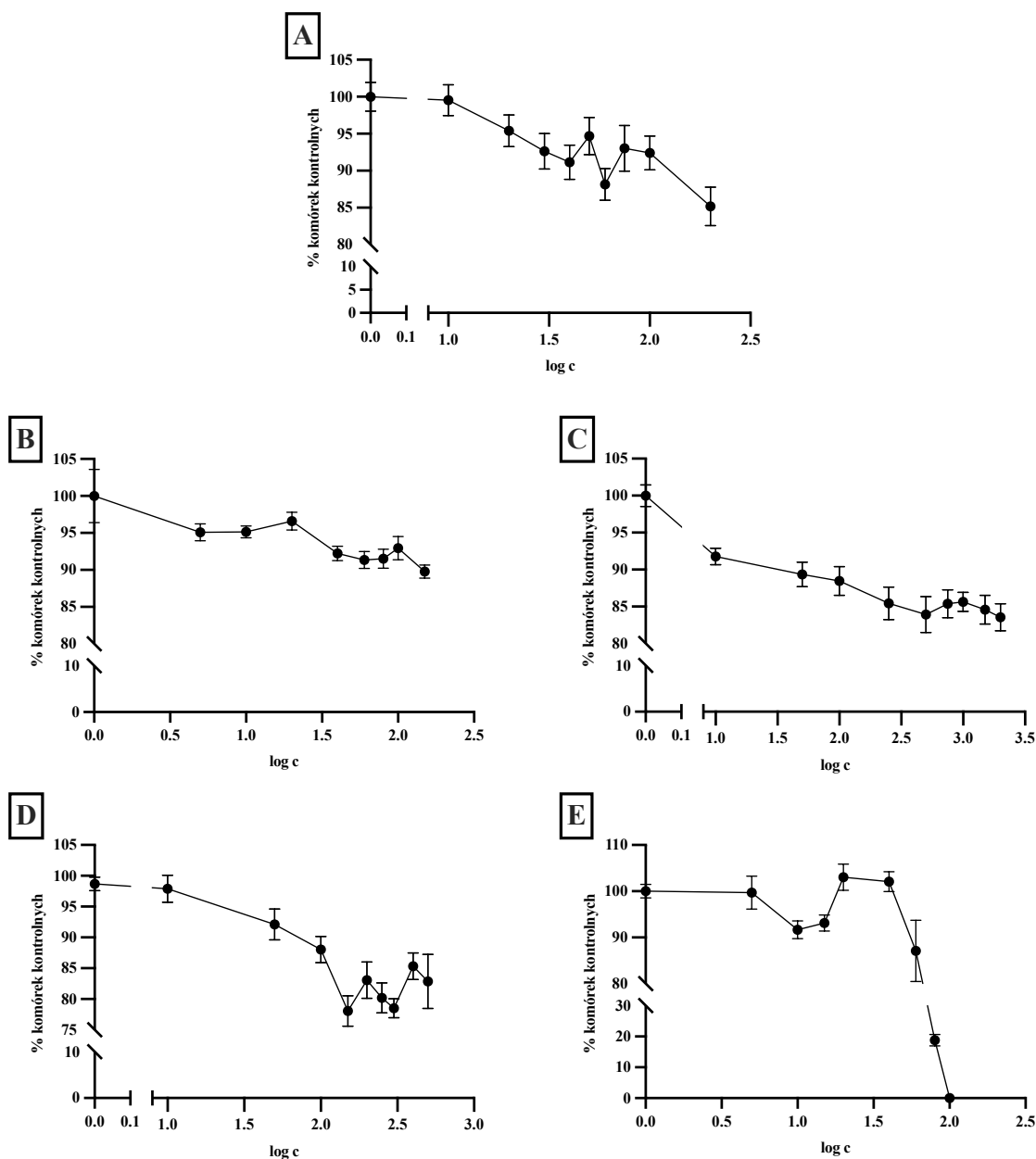
Ocena właściwości antyoksydacyjnych EGT w układzie komórkowym

EGT w wybranym zakresie stężeń (10-200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) nie powodowała istotnych zmian w przeżywalności komórek linii SH-SY5Y. EGT spowodowała obniżenie przeżywalności hodowli o maksymalnie 12% względem wartości kontrolnych (Ryc. 5A).

W układzie komórkowym sprawdzono toksyczność następujących związków o działaniu utleniającym: nadtlenu wodoru, AAPH, TBOOH i dichromianu potasu. Komórki traktowano wybranymi związkami w zakresie stężeń przez 24 godziny (Ryc. 5). Komórki SH-SY5Y wykazywały odporność na działanie nadtlenu wodoru w stężeniu końcowym 150 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, który spowodował spadek przeżywalności komórek o 10% (Ryc. 5B).

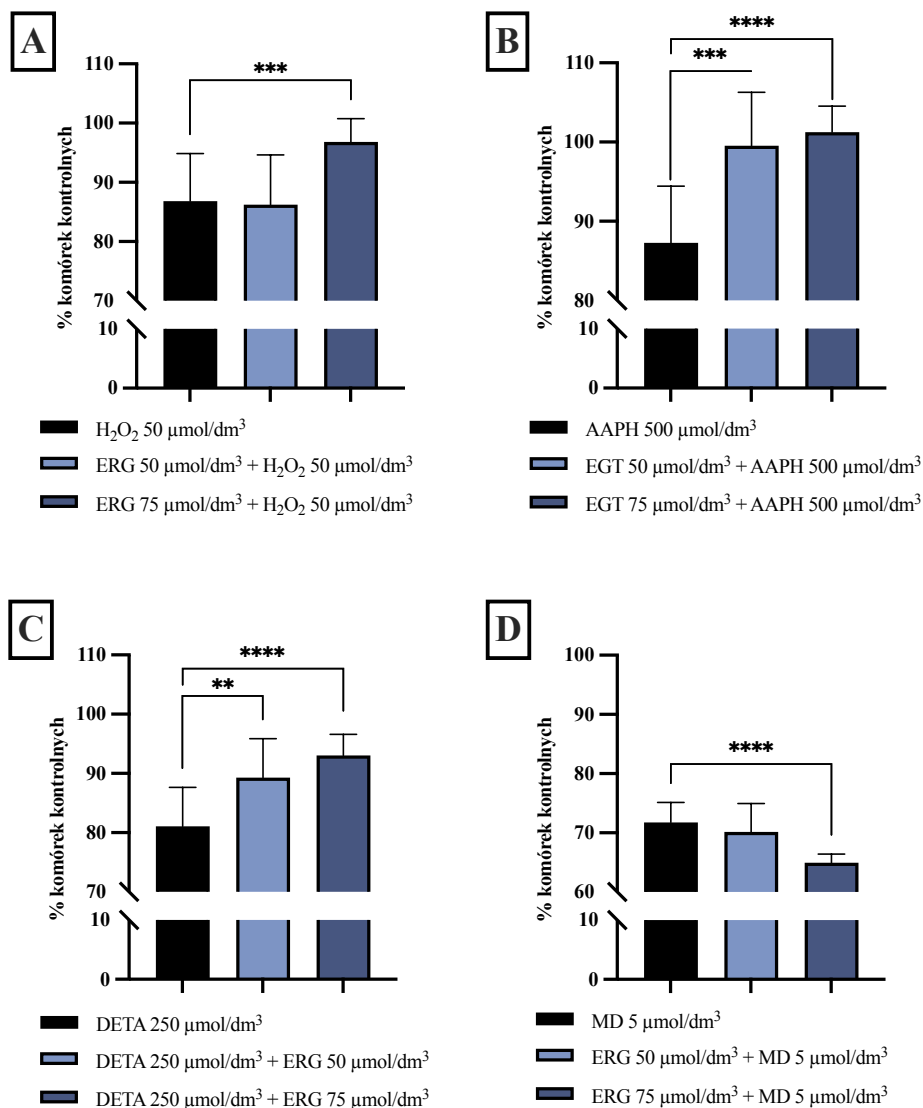
Inkubacja komórek z AAPH w wybranym zakresie stężeń (10-2000 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) również nie spowodowała spadku przeżywalności komórek poniżej 50% wartości kontrolnych (Ryc. 5C). Traktowanie komórek DETA w najwyższym stosowanym stężeniu (500 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) obniżyło przeżywalność hodowli o ok. 20%, choć trend ten utrzymywał się już od stężenia 15,63 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (Ryc. 5D). Ze wszystkich wybranych związków jedynie menadion w zastosowanym zakresie stężeń (5-100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) spowodował śmierć wszystkich komórek ($\text{IC}_{50} = 71,42 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) (Ryc. 5E). Na podstawie powyższych wyników dobrano stężenia substancji do kolejnych doświadczeń bazując na toksyczności badanych związków względem komórek linii SH-SY5Y. Wybrano stężenia, które nie powodowały spadku przeżywalności większego niż 25% względem komórek kontrolnych.

Kolejne doświadczenie miało na celu ocenę zdolności EGT do zapobiegania śmierci komórek indukowanej przez substancje o działaniu utleniającym. Komórki linii SH-SY5Y preinkubowano z jednym z dwóch stężeń EGT: 50 lub 75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny. Po upływie czasu preinkubacji do hodowli komórkowych dodawano związki utleniające i 24-godziny później dokonywano pomiaru przeżywalności. Komórki poddane działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ wykazały przeżywalność na poziomie ($\bar{X} \pm \text{SD}$) $86,84 \pm 8,02\%$ wartości komórek kontrolnych (Ryc. 6A). Preinkubacja komórek z EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ nie spowodowała zmian w przeżywalności ($86,24 \pm 8,38\%$) względem próby z nadtlaniem wodoru. Z kolei EGT w stężeniu 75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ wywołało efekt ochronny w komórkach SH-SY5Y ($96,83 \pm 3,95\%$) zapobiegając spadkowi 10% przeżywalności względem komórek traktowanych samym nadtlaniem wodoru ($p = 0,0002$).



Rycina 5. Przeżywalność komórek linii SH-SY5Y traktowanych substancjami badanymi zmierzona metodą redukcji resazuryny. Komórki traktowano przez 24 godziny następującymi związkami w podanym zakresie stężeń: (A) EGT 10-200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$; (B) H_2O_2 5-150 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$; (C) AAPH 10-2000 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$; (D) DETA 10-500 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$; (E) MD 5-100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Dane wyrażono jako udział procentowy komórek nietraktowanych związkiem badanym. Stężenia związków na osi OX przedstawiono w postaci logarytmu naturalnego ze stężeń końcowych badanego związku. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SD, $n = 6$.

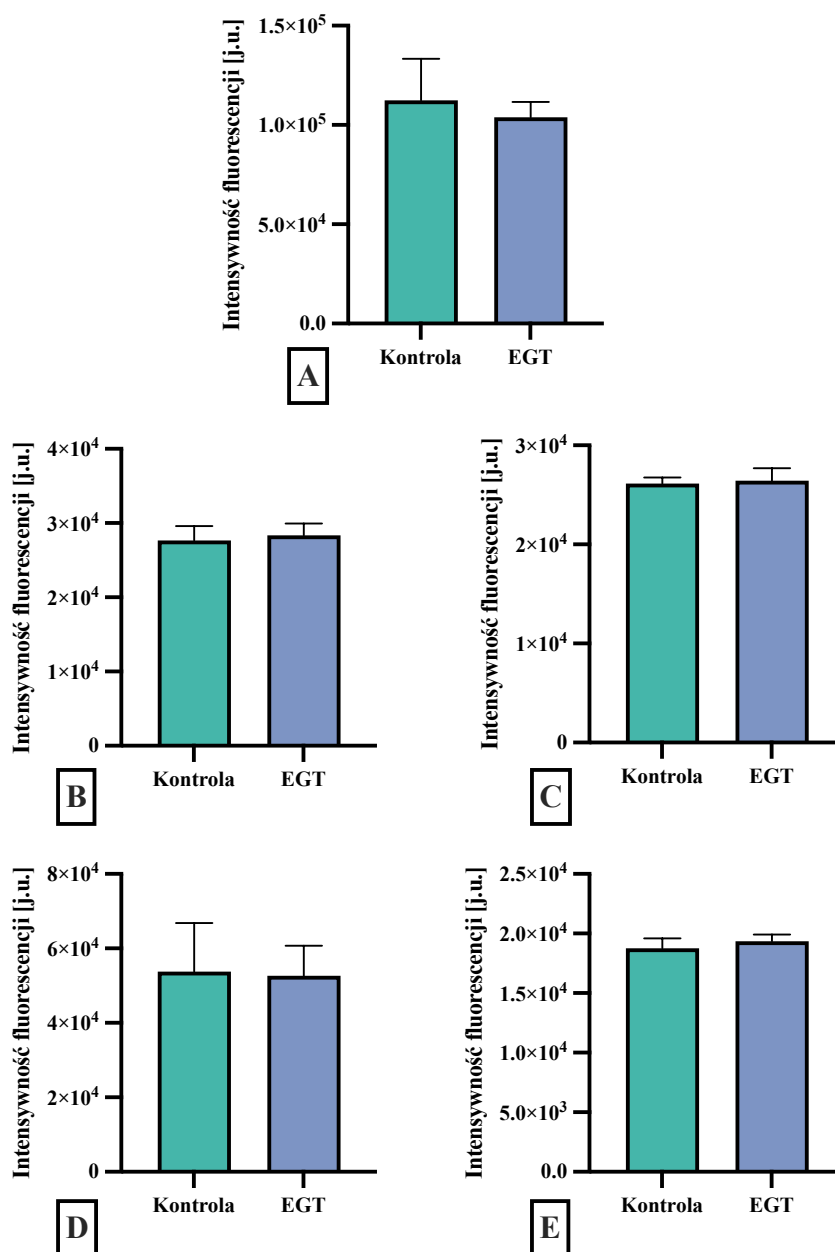
Przeżywalność komórek traktowanych AAPH w stężeniu 500 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ wyniosła $87,29 \pm 7,15\%$ względem komórek kontrolnych (Ryc. 6B). Preinkubacja z EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ zmniejszyła śmiertelność komórek spowodowaną przez AAPH, prowadząc do osiągnięcia przeżywalności przez próbę równej $99,52 \pm 6,77\%$ wartości kontrolnych ($p = 0,0002$).



Rycina 6. Przeżywalność komórek linii SH-SY5Y zmierzona metodą redukcji resazuryny. Komórki preinkubowano przez 24 godziny z EGT w stężeniach 50 i 75 μmol/dm³ a następnie traktowano przez 24 godziny następującymi związkami: (A) H₂O₂ 50 μmol/dm³; (B) AAPH 500 μmol/dm³; (C) DETA 250 μmol/dm³; (D) MD 5 μmol/dm³. Dane wyrażono jako udział procentowy komórek nietraktowanych związkiem badanym. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SD.

EGT w stężeniu 75 μmol/dm³ wywołało efekt ochronny względem toksycznego działania AAPH (101,3 ± 3,29%) (p < 0,0001). 24-godzinna inkubacja z DETA w stężeniu 250 μmol/dm³ spowodowała spadek przeżywalności względem komórek kontrolnych o ok. 20% (81,08 ± 6,56%) (Ryc. 6C). Suplementacja komórek EGT w stężeniach 50 i 75 μmol/dm³ chroniła przed działaniem toksycznym indukowanym przez DETA kolejno o 8% (89,28 ± 6,57%) (p= 0,0019) i 12% (93,02 ± 3,55%) (p < 0,0001). Preinkubacja komórek z EGT i poddanie ich działaniu MD spowodowało uzyskanie efektu odwrotnego do obserwowanego przy pozostałych oksydantach. Hodowle traktowane menadionem

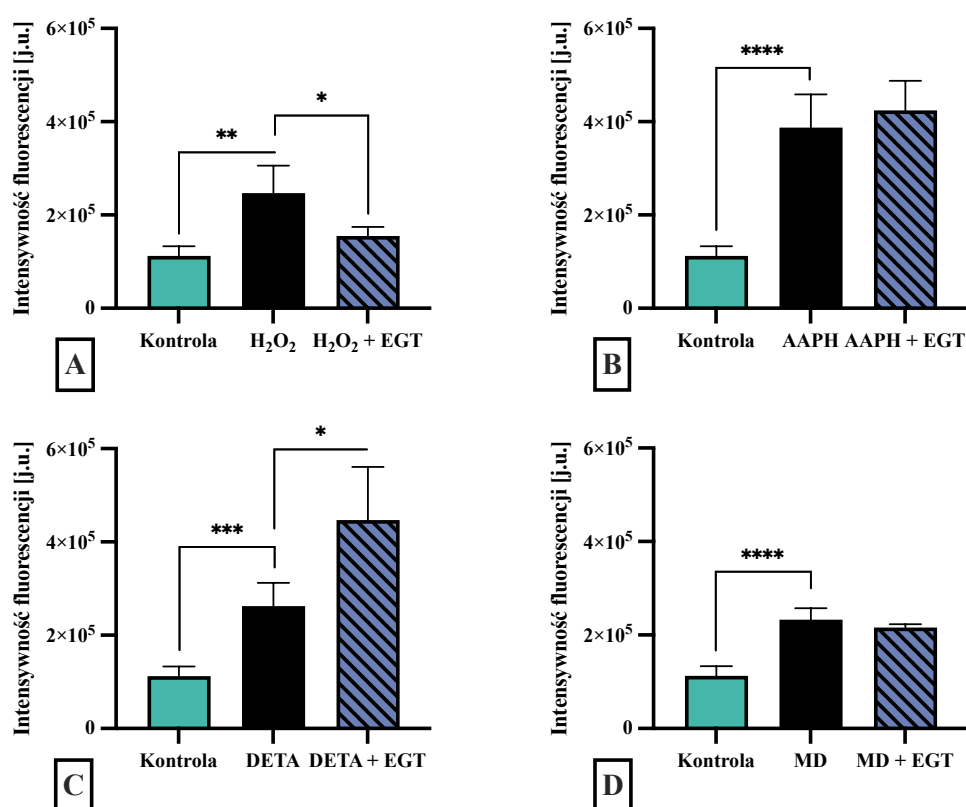
w stężeniu $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ osiągnęły przeżywalność na poziomie $71,75 \pm 3,38\%$ (Ryc. 6D). Preinkubacja z EGT w stężeniu $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ nie wpłynęła na przeżywalność komórek inkubowanych z MD ($p = 0,429$). Natomiast EGT w stężeniu $75 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ uwrażliwiła komórki na działanie MD powodując istotny statystycznie spadek przeżywalności do $64,98 \pm 1,42\%$ ($p < 0,0001$).



Rycina 7. Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu i azotu przy użyciu sond fluorescencyjnych w komórkach linii SH-SY5Y. Komórki inkubowano z ergotioneiną (EGT) w stężeniu $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny w warunkach standardowych. Pomiaru fluorymetrycznego wykonywano z wykorzystaniem sond: (A) H₂DCF-DA, (B) DHE 500/576 nm, (C) MitoSOX, (D) DHR123, (E) DAF-FM. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm odchylenie standardowe w jednostce umownej intensywności fluorescencji [j.u.].

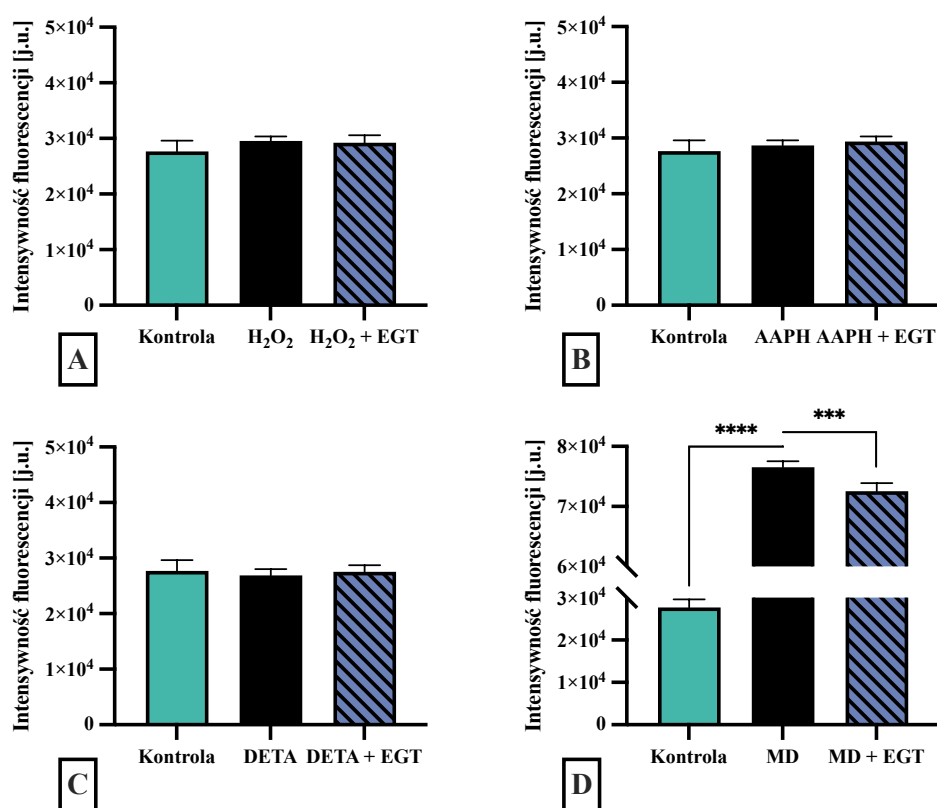
Aby dostarczyć danych na temat generacji reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) w komórkach linii SH-SY5Y preinkubowanych z EGT i traktowanych związkami prooksydacyjnymi przeprowadzono szereg eksperymentów z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych. Do pomiaru wykorzystano następujące sondy fluorescencyjne: H₂DCF-DA, DHE, MitoSOX™ Red, DHR123 i DAF-FM. Komórki preinkubowane z EGT w stężeniu 50 μmol/dm³ nie wykazywały żadnych znaczących różnic w poziomie RFT i RFA niezależnie od wykorzystanej do pomiaru sondy fluorescencyjnej (Ryc. 7).

Następnie komórki preinkubowane z EGT poddano działaniu związków utleniających i przy użyciu sond fluorescencyjnych zmierzono poziom RFT/RFA. Pomiar sondą H₂DCF-DA wykazał podwyższenie poziomu RFT po inkubacji z H₂O₂ względem wartości kontrolnych (p= 0,0013) (Fig. 8A).



Rycina 8. Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu przy użyciu sondy fluorescencyjnej H₂DCF-DA w komórkach linii SH-SY5Y. Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu 50 μmol/dm³ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 24 godziny związkami o działaniu utleniającym: (A) H₂O₂ 50 μmol/dm³, (B) AAPH 500 μmol/dm³, (C) DETA 250 μmol/dm³, (D) MD 5 μmol/dm³. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych ± SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji [j.u.].

Preinkubacja z EGT spowodowała obniżenie generacji RFT wywołanej przez H_2O_2 w komórkach linii SH-SY5Y o 32% ($p=0,0105$). 24-godzinna inkubacja z AAPH wywołała zwiększenie poziomu RFT względem komórek kontrolnych ($p < 0,0001$) (Ryc. 8B). Suplementacja komórek EGT nie wpłynęła na poziom RFT komórek inkubowanych z AAPH ($p=0,4125$). Komórki traktowane związkami DETA wykazywały wyższy poziom RFT względem wartości kontrolnych ($p=0,0003$); preinkubacja komórek z EGT wzmocniła efekt generacji RFT wywołany przez DETA ($p=0,0106$) (Ryc. 8C). Inkubacja komórek z MD (Ryc. 8D) spowodowała zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu RFT względem komórek kontrolnych ($p < 0,0001$). Zastosowanie preinkubacji z EGT nie wpłynęło na poziom RFT w komórkach ($p=0,1687$).



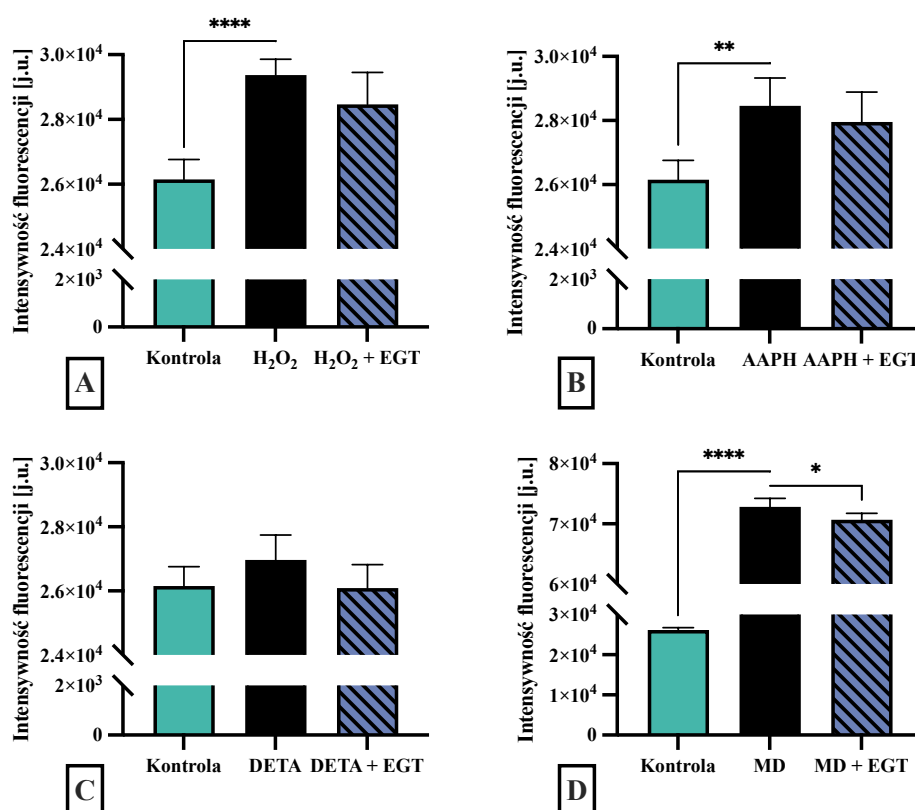
Rycina 9. Pomiar poziomu anionorodnika ponadtlenkowego przy użyciu sondy fluorescencyjnej DHE w komórkach linii SH-SY5Y. Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 24 godziny związkami o działaniu utleniającym: (A) H_2O_2 $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (B) AAPH $500 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (C) DETA $250 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (D) MD $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji [j.u.].

Poziom nadtlenków, w szczególności anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), zmierzono za pomocą dihydroetydyny (DHE) (Ryc. 9). DHE to wnikający do komórek barwnik fluorescencyjny, który reaguje z $O_2^{\cdot-}$, w wyniku tej reakcji powstaje 2-hydroksyetydyna.

Jak przedstawiono na rycinie 9: EGT, H₂O₂ (Ryc. 9A), AAPH (Ryc. 9B) oraz DETA (Ryc. 9C) w stosowanym zakresie stężeń nie spowodowały generacji O₂^{•-} w komórkach SH-SY5Y.

Z kolei MD (Ryc. 9D) przyczynił się do niespełna trzykrotnego zwiększenia generacji O₂^{•-} względem komórek kontrolnych (p < 0,0001). W komórkach preinkubowanych z EGT wykryto niższy poziom anionorodnika ponadtlenkowego po traktowaniu MD (p= 0,0007).

Sonda fluorescencyjna MitoSOX Red wykorzystywana jest do pomiaru wewnątrzmitochondrialnego poziomu O₂^{•-} (Ryc. 10).



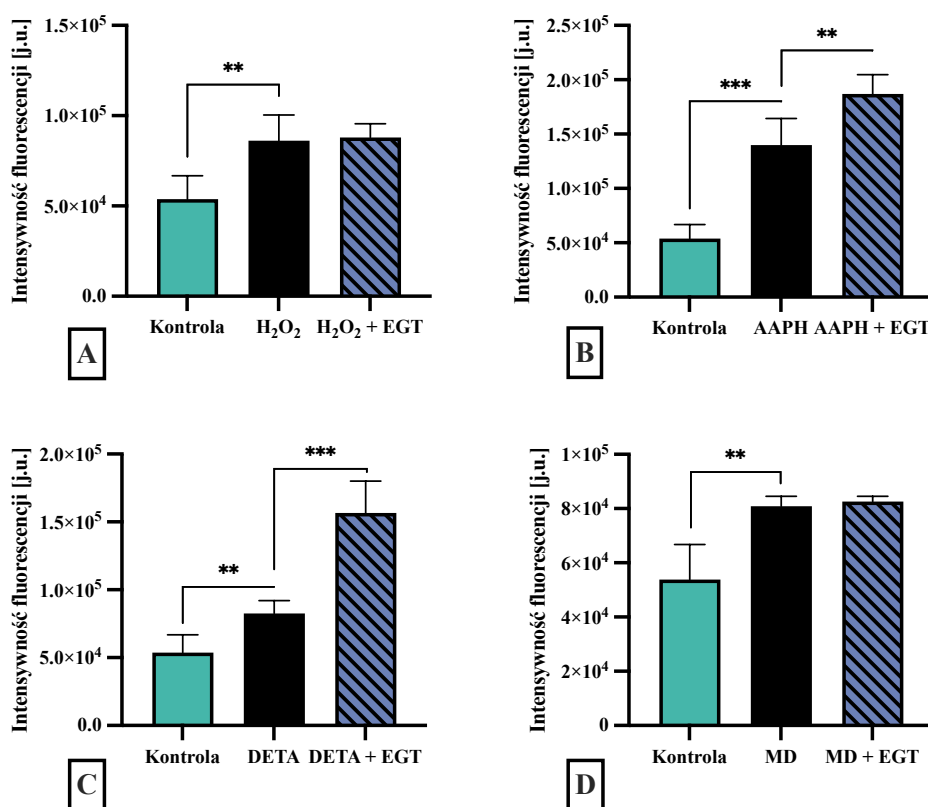
Rycina 10. Pomiar poziomu anionorodnika ponadtlenkowego przy użyciu sondy fluorescencyjnej MitoSOXTM Red w mitochondriach komórek linii SH-SY5Y. Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu 50 μmol/dm³ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 24 godziny związkami o działaniu utleniającym: (A) H₂O₂ 50 μmol/dm³, (B) AAPH 500 μmol/dm³, (C) DETA 250 μmol/dm³, (D) MD 5 μmol/dm³. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych ± SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji [j.u.].

Traktowanie komórek linii SH-SY5Y H₂O₂ spowodowało znaczny wzrost poziomu O₂^{•-} w mitochondriach (p < 0,0001), który nie został zniesiony przez preinkubację z EGT (p= 0,1059) (Ryc. 10A). Zbliżone wyniki otrzymano po inkubacji komórek z AAPH, który spowodował wzrost poziomu O₂^{•-} w mitochondriach (p= 0,0013) (Ryc. 10B).

Również i w tym przypadku stres oksydacyjny nie został zniesiony poprzez preinkubację z EGT ($p= 0,4059$). Traktowanie komórek donorem tlenu azotu (Ryc. 10C) nie spowodowało zmian w poziomie $O_2^{\cdot-}$ w mitochondriach ($p= 0,1031$), podobnie jak jednoczesna inkubacja z DETA i EGT ($p= 0,1031$).

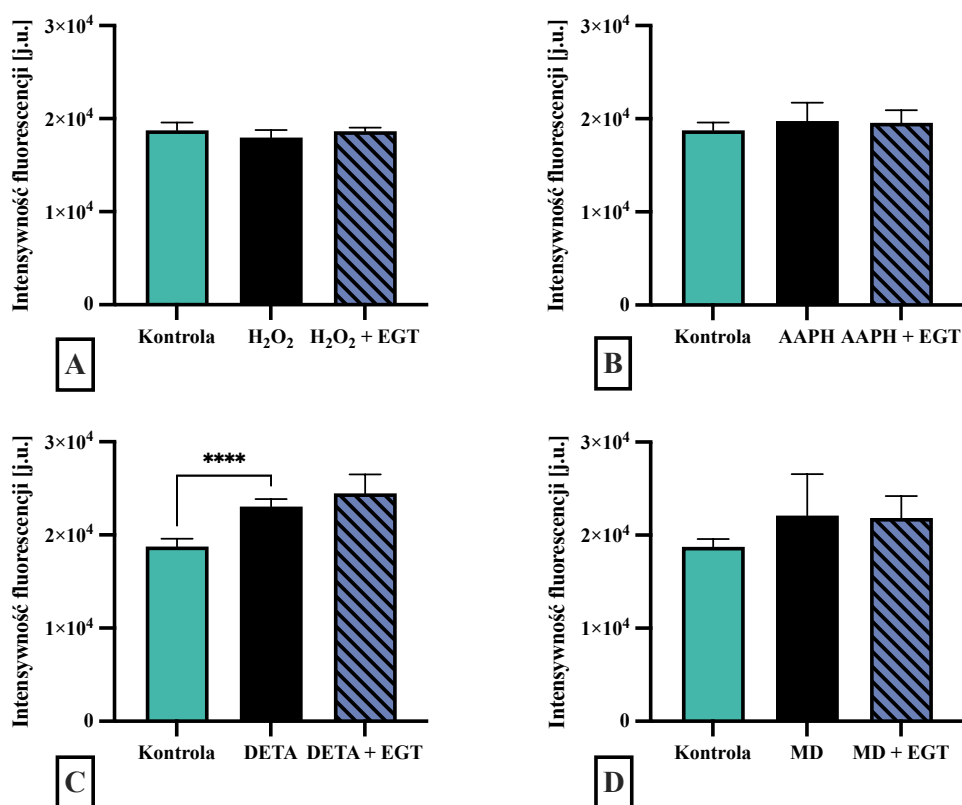
Efekt wywołany przez MD jest zbliżony do tego otrzymanego w eksperymencie z sondą DHE (Ryc. 9). Także w tym przypadku (Ryc. 10D) traktowanie komórek MD spowodowało nagromadzenie $O_2^{\cdot-}$ wewnątrz mitochondriów w porównaniu do komórek kontrolnych ($p < 0,0001$) a suplementacja EGT złagodziła ten efekt ($p= 0,025$).

Pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu H_2O_2 przeprowadzono przy użyciu sondy fluorescencyjnej DHR123. Po 24 godzinach inkubacji z H_2O_2 odnotowano istotną statystycznie zmianę ($p= 0,0057$) w poziomie RFT wewnątrz komórek (Ryc. 11A).



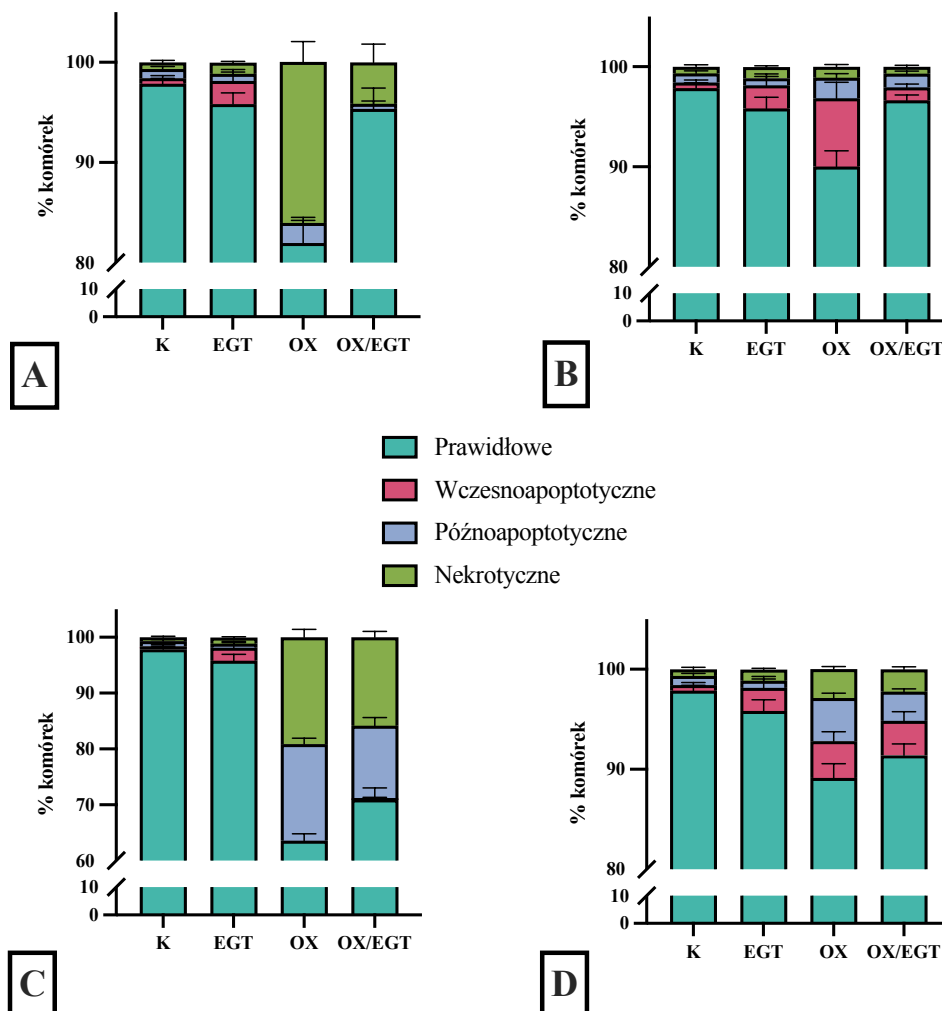
Rycina 11. Pomiar poziomu nadtlenu wodoru przy użyciu sondy fluorescencyjnej DHR123 w komórkach linii SH-SY5Y. Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 24 godziny związkami o działaniu utleniającym: (A) H_2O_2 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (B) AAPH 500 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (C) DETA 250 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (D) MD 5 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji [j.u.].

Preinkubacja z EGT nie wpłynęła na wewnątrzkomórkowy poziom RFT ($p= 0,8028$). Traktowanie komórek AAPH spowodowało wzrost poziomu H_2O_2 w komórkach linii SH-SY5Y względem komórek kontrolnych ($p= 0,0001$) (Ryc. 11B). Zastosowanie preinkubacji z EGT wzmocniło efekt generacji RFT względem komórek inkubowanych tylko z AAPH ($p= 0,0085$). Zbliżone dane otrzymano z komórek inkubowanych z DETA i preinkubowanych z EGT (Ryc. 11C). 24-godzinna inkubacja z DETA spowodowała wzrost poziomu H_2O_2 względem wartości kontrolnych ($p= 0,004$) a zastosowanie preinkubacji z EGT wzmocniło ten efekt, prowadząc do ponad dwukrotnego wzrostu poziomu H_2O_2 względem wartości kontrolnych (DETA vs. DETA + EGT, $p= 0,0002$). Traktowanie komórek MD (Ryc. 11D) przyczyniło się do wzrostu poziomu H_2O_2 względem komórek kontrolnych ($p= 0,0021$). Suplementacja EGT nie wpłynęła na poziom H_2O_2 modulowany przez MD ($p= 0,3681$).



Rycina 12. Pomiar poziomu tlenu azotu przy użyciu sondy fluorescencyjnej DAF-FM w komórkach linii SH-SY5Y. Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 24 godziny związkami o działaniu utleniającym: (A) H_2O_2 $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (B) AAPH $500 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (C) DETA $250 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (D) MD $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji [j.u.].

Do pomiaru poziomu tlenu azotu wykorzystano sondę fluorescencyjną DAF-FM. Ze wszystkich testowanych substancji tylko traktowanie komórek związkiem DETA NONOate (Ryc. 12C) przyczyniło się do wzrostu poziomu NO w komórkach linii SH-SY5Y ($p < 0,0001$). Pozostałe związki i EGT nie wpłynęły na poziom NO.



Rycina 13. Pomiar modulacji procesu apoptozy w komórkach linii SH-SY5Y traktowanej ergotioneiną i wybranymi związkami o działaniu utleniającym. Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu $75 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 24 godziny związkami o działaniu utleniającym: (A) H_2O_2 $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (B) AAPH $500 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (C) DETA $250 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (D) MD $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Komórki wybarwiono jodkiem propidyny i Hoechst 33342. Na wykresach próby opisano jako: (K) komórki kontrolne; (EGT) komórki inkubowane z ergotioneiną $75 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$; (OX) komórki inkubowane z H_2O_2 /AAPH/DETA/MD; (OX/EGT) komórki preinkubowane z ergotioneiną $75 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ a następnie inkubowane z OX. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm odchylenie standardowe udziału procentowego populacji komórek w zależności od stopnia zaawansowania procesu apoptozy.

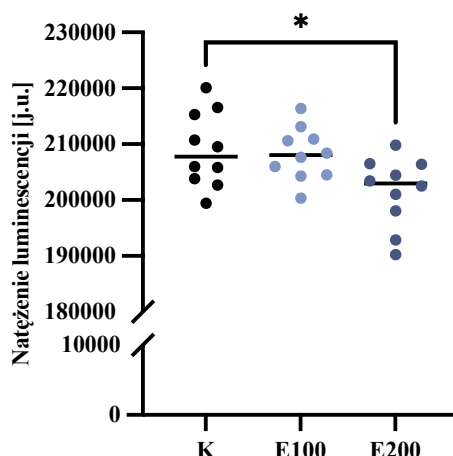
Generacja reaktywnych form tlenu w komórkach eukariotycznych może prowadzić do aktywacji procesu apoptozy. W celu określenia poziomu aktywacji szlaków apoptozy przeprowadzono doświadczenie z wykorzystaniem jodku propidyny i barwnika

Hoechst 33342. Preinkubacja komórek linii SH-SY5Y z EGT powodowała efekt ochronny przed cytotoksycznym działaniem H_2O_2 , obniżając udział komórek nekrotycznych o ponad 10% (16,06% komórek nekrotycznych dla czynnika utleniającego (OX), 4,15% komórek nekrotycznych dla OX/EGT; $p= 0,0006$, $n= 16$) (Ryc. 13A). W przypadku traktowania komórek AAPH nie odnotowano znaczącego wzrostu ilości komórek nekrotycznych (Ryc. 13B). AAPH spowodowało zwiększenie udziału komórek będących na wczesnym etapie apoptozy w odniesieniu do próby kontrolnej (OX 6,83% i K 0,58%; $p= 0,0017$, $n= 16$). Preinkubacja z EGT chroniła przed inicjalizacją apoptozy, dzięki czemu udział komórek na etapie wczesnej apoptozy spadł do poziomu zbliżonego do komórek kontrolnych (OX 6,83% i OX/EGT 1,3%; $p= 0,045$, $n= 16$). DETA po 24 godzinach inkubacji spowodował wzrost ilości komórek nekrotycznych wyższy o 18,5% względem komórek kontrolnych (K 0,65% i OX 19,11%; $p < 0,0001$, $n= 16$) (Ryc. 13C). Traktowanie komórek DETA doprowadziło również do zwiększenia udziału komórek na etapie późnej apoptozy (K 0,913% i 17,33%; $p < 0,0001$, $n= 16$). Preinkubacja komórek z EGT nie spowodowała zmian w ilości komórek nekrotycznych w porównaniu do komórek traktowanych DETA. Jednakże, w hodowli komórek preinkubowanej z EGT, udział komórek będących w stanie zaawansowanej apoptozy uległ redukcji z wartości OX 17,33% do wartości OX/EGT 12,99% ($p= 0,029$, $n= 16$) (Ryc. 13C). MD po 24-godzinnej inkubacji spowodował indukcję apoptozy u około 10% komórek (Ryc. 13D). Zastosowanie preinkubacji z EGT spowodowało obniżenie ilości komórek znajdujących się w stanie zaawansowanej apoptozy z OX 4,33% do OX/E75 2,9% ($p= 0,021$; $n= 16$). Udział komórek w stanie nekrozy i apoptozy nie uległ zmianie pod wpływem preinkubacji komórek z EGT.

Następnie przeprowadzono doświadczenia mające na celu ocenę wpływu ergotioneiny na metabolizm komórkowy poprzez modulację poziomu ATP (Ryc. 14). W tym celu komórki linii SH-SY5Y poddano działaniu ergotioneiny w stężeniu 100 i 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny i sprawdzono poziom ATP metodą luminometryczną. Niższe stężenie ergotioneiny nie spowodowało zmian w ilości wewnątrzkomórkowego ATP względem komórek kontrolnych ($p= 0,77$, $n= 10$). Ergotioneina w stężeniu 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ spowodowała istotną statystycznie różnicę w poziomie ATP względem komórek kontrolnych ($p= 0,0186$, $n= 10$).

Przedstawione kolejno wyniki miały na celu określenie wpływu EGT na parametry komórek poddanych działaniu chlorku litu. LiCl wykorzystany został jako kontrola pozytywna inhibicji kinazy GSK3. Niemniej lit nie jest inertny względem komórek eukariotycznych – dodany do hodowli komórkowej wywołuje niewielki, lecz zauważalny

efekt cytotoksyczny. Z uwagi na to w niniejszym rozdziale poruszono również kwestię złagodzenia tego działania przez preinkubację komórek z EGT.



Rycina 14. Poziom ATP w komórkach linii SH-SY5Y traktowanych ergotioneiną w stężeniu 100 lub 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. (K) komórki kontrolne; (E100) komórki traktowane ergotioneiną 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$; (E200) komórki traktowane ergotioneiną 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Poziome kreski wyznaczają medianę dla każdej z prób. Istotność statystyczną wyliczono przy użyciu testu t-Studenta.

Ocena potencjału EGT do modulacji sygnalizacji zależnej od kinazy GSK3

Aby ocenić wpływ LiCl na komórki SH-SY5Y przeprowadzono pomiary przeżywalności komórek. Komórki badano w dwóch wariantach, pierwszym kontrolnym i drugim preinkubowanym przez 24 godziny z EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Następnie do komórek dodawano LiCl w pełnej pożywce hodowlanej do stężenia końcowego w zakresie 0,78 – 200 mmol/dm^3 i pozostawiano do inkubacji na 24, 48 lub 72 godziny. W zależności od czasu inkubacji otrzymano następujące wyniki przeżywalności (Tab. 3).

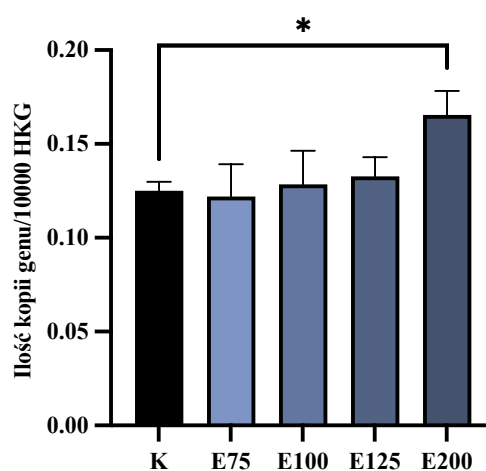
Tabela 3. Przeżywalność komórek linii SH-SY5Y preinkubowanych z ergotioneiną (50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i traktowanych chlorkiem litu w zakresie stężeń 0,78 – 200 mmol/dm^3 .

Próbka	Czas inkubacji	IC ₅₀	95% przedział ufności
LiCl	24 godziny	85,59 mmol/dm^3	73,64 – 100,7 mmol/dm^3
	48 godzin	35,58 mmol/dm^3	29,82 – 42,84 mmol/dm^3
	72 godziny	18,14 mmol/dm^3	15,3 – 21,77 mmol/dm^3
EGT + LiCl	24 godziny	82,01 mmol/dm^3	71,1 – 95,68 mmol/dm^3
	48 godzin	32,16 mmol/dm^3	27,71 – 37,54 mmol/dm^3
	72 godziny	19,54 mmol/dm^3	16,21 – 23,93 mmol/dm^3

Komórki SH-SY5Y inkubowane z LiCl przez 24 godziny cechowały się parametrem IC₅₀ równym 85,59 mmol/dm^3 (95% przedział ufności 73,64 – 100,7 mmol/dm^3) podczas gdy komórki preinkubowane z EGT osiągnęły parametr IC₅₀ na poziomie 82,01 mmol/dm^3

(95% przedział ufności 71,1 – 95,68 mmol/dm³). Nie wykazano istotności statystycznej dla preinkubacji z EGT po 24 godzinach inkubacji z LiCl. Hodowle komórkowe poddane 48-godzinnemu traktowaniu LiCl osiągnęły parametry IC₅₀ kolejno dla komórek nieinkubowanych z EGT 35,58 mmol/dm³ (95% przedział ufności 29,82 – 42,84 mmol/dm³) i preinkubowanych z EGT 32,16 mmol/dm³ (95% przedział ufności 27,71 – 37,54 mmol/dm³). Komórki nieinkubowane z EGT i traktowane przez 72 godziny LiCl w podanych stężeniach uzyskały IC₅₀= 18,14 mmol/dm³ (95% przedział ufności 15,3 – 21,77 mmol/dm³), podczas gdy komórki preinkubowane z EGT wykazały IC₅₀= 19,54 mmol/dm³ (95% przedział ufności 16,21 – 23,93 mmol/dm³).

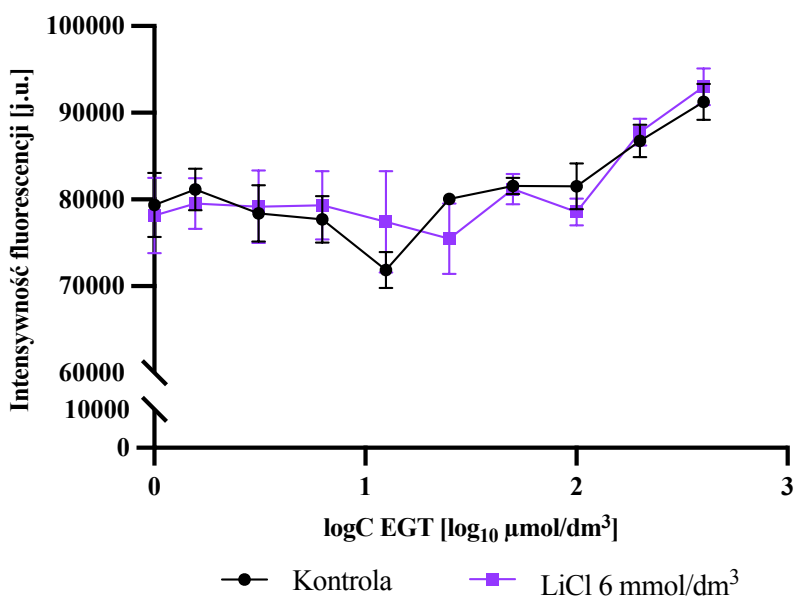
W celu oceny ekspresji genu kodującego SLC22A4 wykonano doświadczenie qPCR na mRNA wyizolowanym z hodowli traktowanej EGT. Endogenna ekspresja genu *slc22a4* w komórkach linii SH-SY5Y wynosi około 0,12 kopii genu na 10000 kopii genu referencyjnego (Ryc. 15). Doświadczenia wykazały, że 24-godzinna inkubacja komórek linii SH-SY5Y z EGT we wspomnianych stężeniach nie wpływa na ekspresję genu kodującego transporter SLC22A4. Dopiero stężenie EGT równe 200 μmol/dm³ spowodowało modulację ekspresji genu *slc22a4* względem komórek kontrolnych (p= 0,0404, n= 4).



Rycina 15. Ekspresja genu *slc22a4* w komórkach linii SH-SY5Y traktowanych przez 24 godziny ergotioneiną w szeregu stężeń 75 – 200 μmol/dm³. Wyniki przedstawiono jako ilość kopii genu *slc22a4* na 10000 (dziesięć tysięcy) kopii genu referencyjnego (*rpl13a*, *b2m*). Wyniki wyrażono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych ± SEM. Istotność statystyczną wyliczono testem t-Studenta (n= 4).

Do przeprowadzenia dalszych doświadczeń wybrano najwyższe stężenie LiCl, które nie powodowało cytotoksyczności ostrej względem badanych komórek (6 mmol/dm³). Postanowiono nie kontynuować doświadczenia z wykorzystaniem wyższych stężeń EGT z uwagi na niższą niż przewidywana toksyczność LiCl.

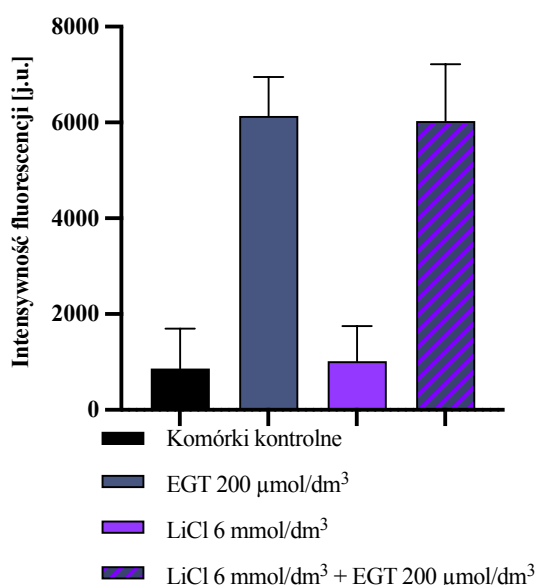
W celu oceny potencjału chlorku litu do generacji RFT przeprowadzono pomiary fluorymetryczne komórek preinkubowanych z EGT i traktowanych LiCl. Uzyskane wyniki nie wykazały różnic w generacji RFT pomiędzy próbą traktowaną LiCl a próbą kontrolną. Natomiast komórki preinkubowane z EGT w stężeniu 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i 400 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ wykazywały wyższy poziom RFT od kontroli (200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ $p=0,0109$ $n=3$; 400 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ $p=0,0044$ $n=3$). Do kolejnych doświadczeń z wykorzystaniem pozostałych sond fluorescencyjnych wybrano stężenie EGT równe 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.



Rycina 16. Ocena generacji reaktywnych form tlenu w komórkach linii SH-SY5Y preinkubowanych z ergotioneiną w zakresie stężeń (1,56 – 400 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) przez 24 godziny i traktowanych chlorkiem litu w stężeniu 6 mmol/ dm^3 przez 4 godziny bezpośrednio przed pomiarem. Pomiar reaktywnych form tlenu przeprowadzono za pomocą sondy fluorescencyjnej $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ po 50 minutach inkubacji z sondą. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji [j.u.].

W celu doprecyzowania jakie konkretnie RFT generowane są po preinkubacji z EGT przeprowadzono doświadczenia z bardziej specyficznymi sondami fluorescencyjnymi od $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Komórki SH-SY5Y poddano 24-godzinnej preinkubacji z EGT w stężeniu 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ a następnie traktowano LiCl w stężeniu 6 mmol/ dm^3 przez 4 godziny. Na rycinie 17 przedstawiono wyniki pomiaru po upływie 30 minut inkubacji komórek z sondą fluorescencyjną DHR123. Wartości fluorescencji komórek kontrolnych są niższe niż wartości uzyskiwane przez próbki preinkubowane z EGT. Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że LiCl zastosowany w stężeniu 6 mmol/ dm^3 po 4 godzinach inkubacji z komórkami SH-SY5Y nie powoduje generacji RFT

($p=0,659$, $n=10$), podczas gdy 24-godzinna preinkubacja z EGT w stężeniu $200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ spowodowała ponad 6-krotny wzrost poziomu H_2O_2 względem komórek kontrolnych ($p < 0,0001$, $n=10$). Traktowanie komórek LiCl po preinkubacji z EGT nie spowodowało istotnych zmian w generacji H_2O_2 względem komórek preinkubowanych z EGT, ale nie traktowanych LiCl ($p=0,815$, $n=10$). Wyniki przedstawione na rycinie 17 stanowią potwierdzenie danych uzyskanych w wyniku pomiaru sondą $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, która jest sondą o niskiej specyficzności. Ponadto nie wykryto istotnych różnic w danych pomiarowych uzyskanych z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych DAF-FM, DHE i MitoSOX. Powyższe wyniki sugerują, że EGT w stężeniu $200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ powoduje generację H_2O_2 w komórkach SH-SY5Y a LiCl nie moduluje równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej.

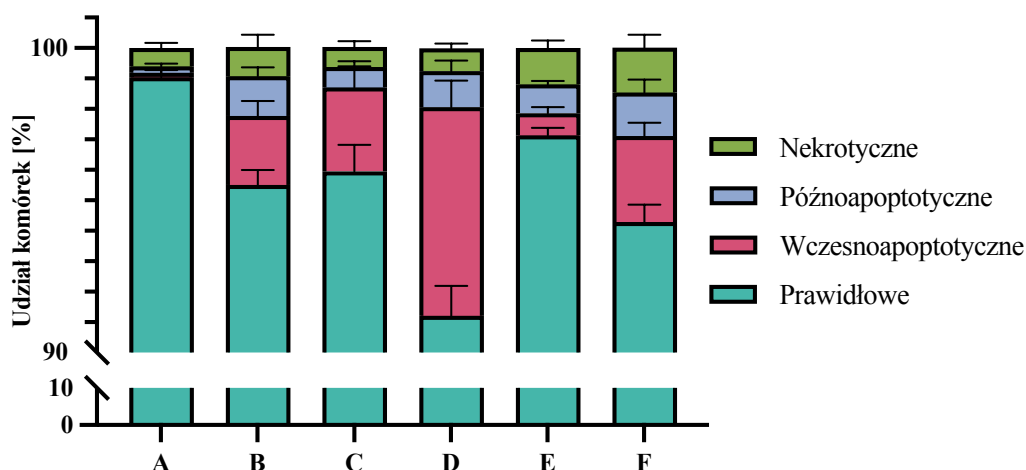


Rycina 17. Ocena generacji reaktywnych form tlenu w komórkach linii SH-SY5Y preinkubowanych z ergotioneiną w stężeniu $200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny i traktowanych chlorkiem litu w stężeniu $6 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ przez 4 godziny bezpośrednio przed pomiarem. Pomiar reaktywnych form tlenu przeprowadzono za pomocą sondy fluorescencyjnej DHR123 po 30 minutach inkubacji z sondą. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji [j.u.].

Pomiar modulacji procesu apoptozy wykazał, że hodowla komórek preinkubowanych z EGT wyraźnie różniła się udziałem komórek w poszczególnych fazach zaawansowania procesu w porównaniu do komórek kontrolnych; po preinkubacji z EGT istotnie wzrosła ilość komórek będących we wczesnej ($p=0,001$, $n=8$) i późnej ($p=0,0031$, $n=8$) fazie apoptozy, ilość komórek nekrotycznych nie uległa zmianie ($p=0,413$, $n=8$) zaś ilość komórek prawidłowych obniżyła się względem wartości kontrolnych ($p < 0,0001$, $n=8$). LiCl w stężeniu $1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ spowodował spadek ilości komórek prawidłowych

($p=0,0043$, $n=8$), wzrost ilości komórek we wczesnej ($p=0,0023$, $n=8$) i późnej ($p=0,0469$, $n=8$) fazie apoptozy, ale nie wpłynął na ilość komórek nekrotycznych ($p=0,81$, $n=8$).

Traktowanie komórek LiCl w stężeniu 6 mmol/dm^3 spowodowało znaczny spadek ilości prawidłowych komórek względem komórek kontrolnych ($p < 0,0001$, $n=8$) oraz wzrost ilości komórek będących we wczesnej ($p < 0,0001$, $n=8$) i późnej ($p=0,0186$, $n=8$) fazie apoptozy. Procentowy udział komórek nekrotycznych nie uległ zmianie względem próby kontrolnej ($p=0,5274$, $n=8$). 24-godzinna preinkubacja z EGT nie wpłynęła na ilość komórek prawidłowych w próbie traktowanej LiCl w stężeniu 1 mmol/dm^3 ($p=0,2121$, $n=8$). Odnotowano spadek ilości komórek będących we wczesnej fazie apoptozy ($p=0,0128$, $n=8$). W hodowli komórek traktowanych wyłącznie LiCl w stężeniu 1 mmol/dm^3 nie wykazano zmian w ilości komórek w późnej fazie apoptozy ($p=0,2066$, $n=8$) i komórek nekrotycznych ($p=0,1139$, $n=8$). Zastosowanie LiCl w stężeniu 6 mmol/dm^3 prowadziło do znacznego zwiększenia ilości komórek będących we wczesnej fazie apoptozy.

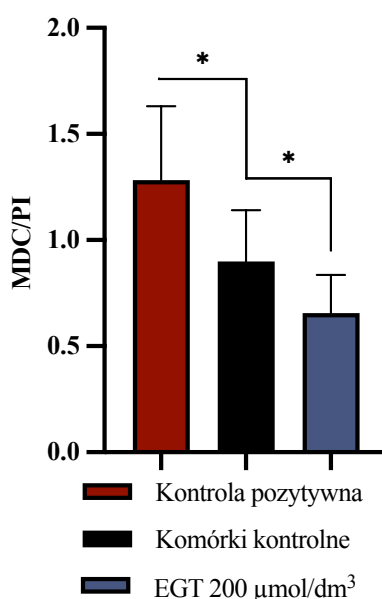


Rycina 18. Pomiar modulacji procesu apoptozy w komórkach linii SH-SY5Y preinkubowanych z ergotioneiną i traktowanych chlorkiem litu. Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu $200\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 24 godziny z chlorkiem litu w stężeniu 1 mmol/dm^3 lub 6 mmol/dm^3 . (A) Komórki kontrolne; (B) Komórki preinkubowane z ergotioneiną; (C) Komórki traktowane chlorkiem litu w stężeniu 1 mmol/dm^3 ; (D) komórki traktowane chlorkiem litu w stężeniu 6 mmol/dm^3 ; (E) komórki preinkubowane z ergotioneiną i traktowane chlorkiem litu w stężeniu 1 mmol/dm^3 ; (F) komórki preinkubowane z ergotioneiną i traktowane chlorkiem litu w stężeniu 6 mmol/dm^3 . Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm odchylenie standardowe udziału procentowego populacji komórek w zależności od stopnia zaawansowania procesu apoptozy.

Zastosowanie preinkubacji z EGT znosiło działanie LiCl w stężeniu 6 mmol/dm^3 chroniąc komórki przed indukcją apoptozy ($p=0,0126$, $n=8$). EGT obniżyła ilość komórek

będących we wczesnej fazie apoptozy ($p=0,0008$, $n=8$) wywołanej LiCl w stężeniu 6 mmol/dm^3 . EGT nie wywołała zmiany w ilości komórek będących w późnej fazie apoptozy ($p=0,737$, $n=8$) i komórek nekrotycznych ($p=0,0922$, $n=8$).

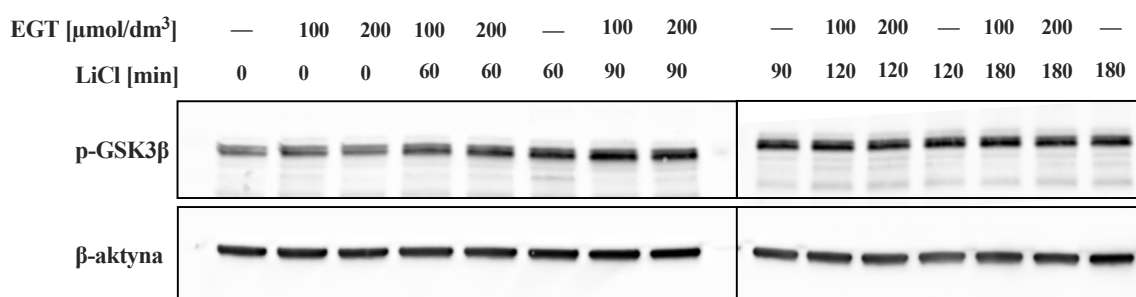
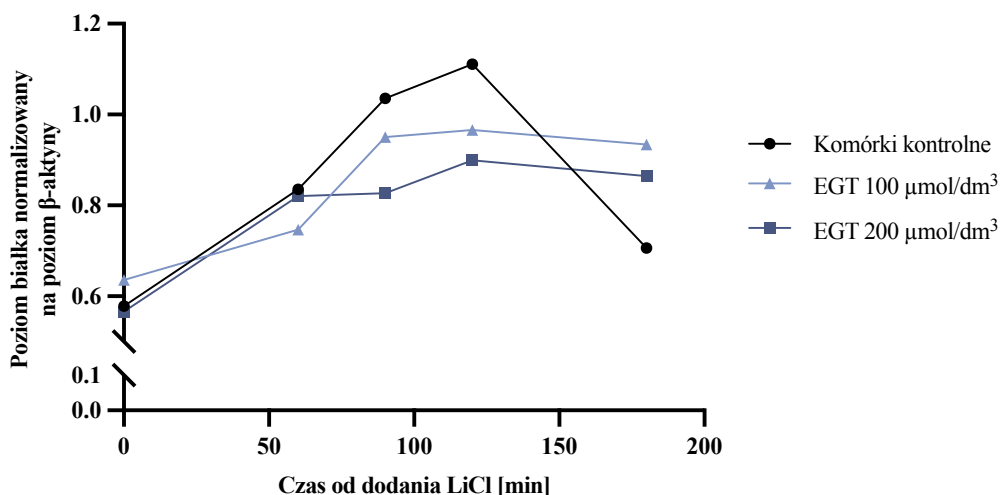
W stosowanym układzie komórkowym suplementacja EGT w stężeniu $200\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$ spowodowała spadek poziomu wakuol autofagowych (Ryc. 19) względem komórek kontrolnych ($p=0,0198$; $n=9$). Jako kontrolę pozytywną zastosowano 24-godziną deprivację surowiczą, która wywołała w hodowli podwyższenie ilości wakuol autofagowych ($p=0,0103$; $n=9$). Przedstawione wyniki dowodzą, że suplementacja EGT obniża ilość wakuol autofagowych w komórkach linii SH-SY5Y. Sugeruje to spadek aktywności autofagii w tych komórkach w porównaniu do próby kontrolnej.



Rycina 19. Poziom wakuol autofagowych w komórkach linii SH-SY5Y suplementowanych ergotioneiną w stężeniu $200\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$ przez 24 godziny. Wyniki pomiarów przedstawiono jako stosunek pomiaru intensywności sygnału fluorescencji monodansylokadaweryny do pomiaru intensywności sygnału fluorescencji jodku propidyny z próby.

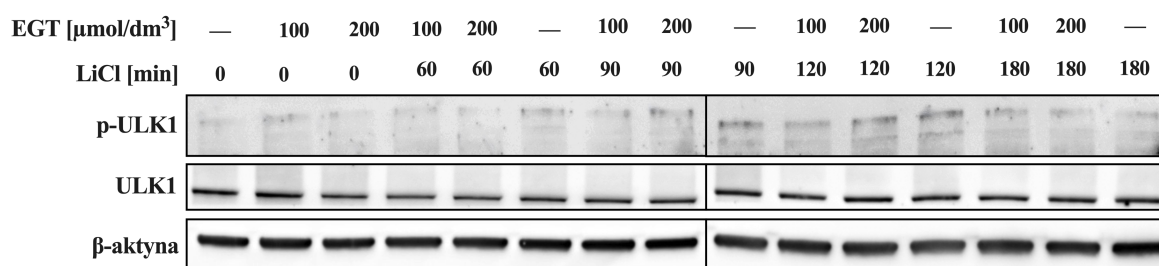
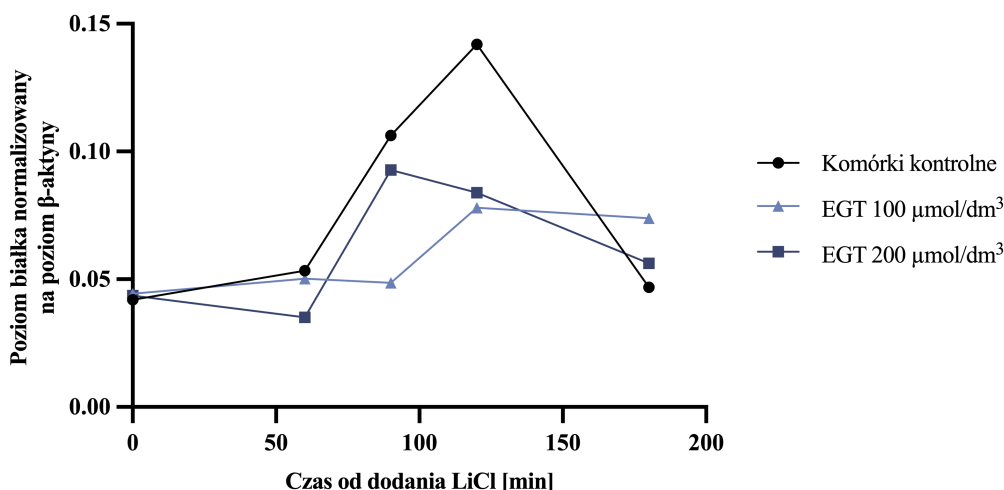
Jednym z wielu sposobów regulacji autofagii jest sygnalizacja wewnątrzkomórkowa zależna od kinazy syntazy glikogenu 3 (GSK3). W celu pomiaru szybkości reakcji fosforylacji GSK3 w pozycji Ser9 inicjowanej przez LiCl przeprowadzono eksperyment, w którym inkubowano komórki z LiCl i przerywano reakcję w interwałach 30 minutowych (Ryc. 20). Niepowodzeniem niestety zakończyły się eksperymenty mające na celu ustalenie poziomu białka GSK3 β w formie nieufosforylowanej. Dysponując danymi dla ufosforylowanej formy GSK3 β można jedynie przypuszczać, że widoczne zmiany znajdują odzwierciedlenie w badanym modelu. Po upływie 60 minut inkubacji z LiCl odnotowano znaczący wzrost poziomu białka p-GSK3 β (Ser9). W zaprezentowanych wynikach można

zauważyć trend sugerujący, że EGT moduluje maksymalny poziom fosforylacji białka GSK3 β , a także spowalnia jego defosforylację. Przedstawione dane sugerują brak zależności stężeniowej EGT (w podanym zakresie stężeń).



Rycina 20. Ekspresja ufosforylowanej formy białka GSK3 β zawierającej grupę fosforanową zlokalizowaną na serynie w pozycji 9 sekwencji aminokwasowej (p-GSK3 β) w komórkach SH-SY5Y preinkubowanych z ergotioneiną i traktowanych chlorkiem litu. Komórki poddano 24-godzinnej preinkubacji z ergotioneiną (100 lub 200 $\mu\text{mol/dm}^3$) w warunkach standardowych a następnie traktowano chlorkiem litu w stężeniu końcowym 6 mmol/dm^3 przez 60, 90, 120 i 180 minut. W podanych interwałach czasu komórki poddawano lizie w celu izolacji białka.

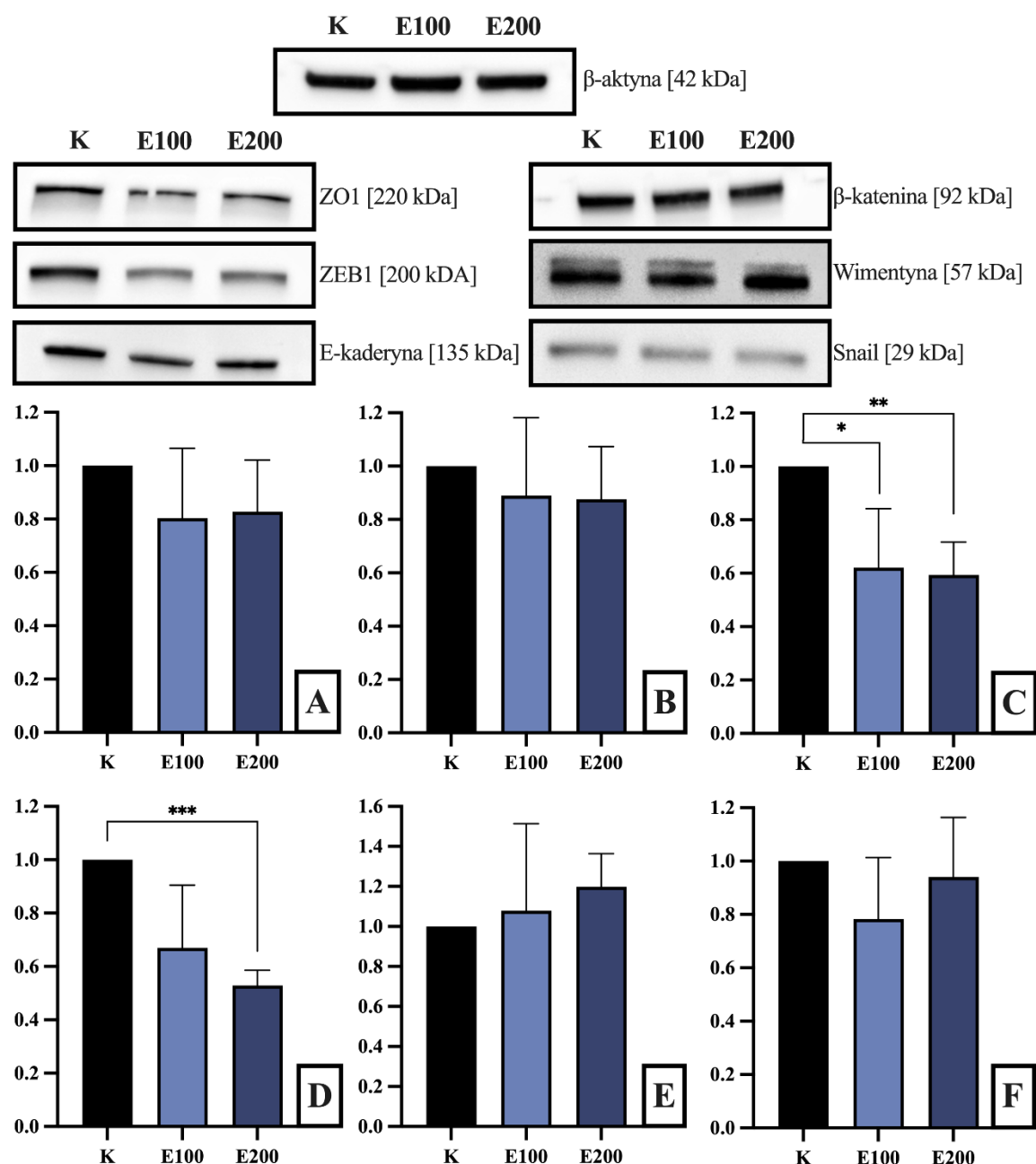
Zastosowanie preinkubacji z EGT spowodowało obniżenie poziomu fosforylacji białka ULK1 względem komórek kontrolnych (Ryc. 21). Podobnie również jak w przypadku białka p-GSK-3 β (Ser9) (Ryc. 20) można zauważyć, że w próbkach preinkubowanych z EGT białko po upływie 120 minut wolniej ulega defosforylacji niż w próbkach kontrolnych. Wyższy poziom białka p-ULK1 (Ser758) może oznaczać wyższą aktywność kinazy odpowiedzialnej za fosforylację obu białek bądź niższy poziom fosfataz odpowiedzialnych za ich defosforylację.



Rycina 21. Ekspresja ufosforylowanej formy białka ULK1 zawierającej grupę fosforanową zlokalizowaną na serynie w pozycji 758 sekwencji aminokwasowej (p-ULK1) w komórkach SH-SY5Y preinkubowanych z ergotioneiną i traktowanych chlorkiem litu. Komórki poddano 24-godzinnej preinkubacji z ergotioneiną (100 lub 200 µmol/dm³) w warunkach standardowych a następnie traktowano chlorkiem litu w stężeniu końcowym 6 mmol/dm³ przez 60, 90, 120 i 180 minut. W podanych interwałach czasu komórki poddawano lizie w celu izolacji białka. Wynik reprezentatywnego eksperymentu.

W celu analizy potencjału EGT do modulacji szlaku EMT zbadano poziom następujących białek: wimentyny, N-kadheryny, Klaudyny-1, β-kateniny, ZO1, Snail, Slug, ZEB1 i E-kadheryny (Ryc. 22). Spośród wymienionych białek w komórkach linii SH-SY5Y nie wykryto ekspresji N-kadheryny i Klaudyny-1, co stoi w zgodzie z danymi przedstawionymi w bazie The Human Protein Atlas [58]. Nie wykryto również białka Slug, które co prawda jest produkowane przez komórki linii SH-SY5Y, lecz niekonstytutywnie.

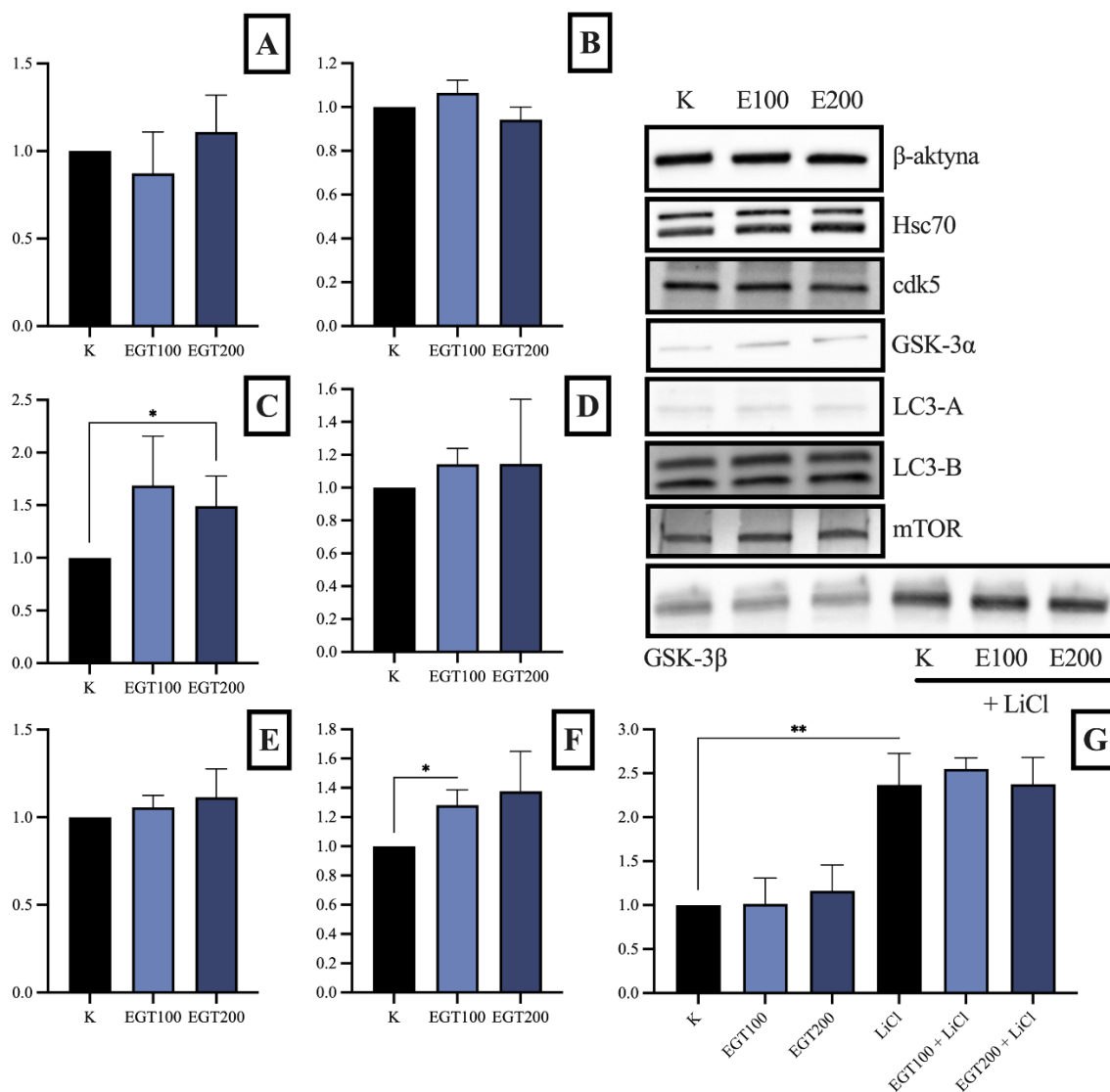
Modulacji po traktowaniu komórek EGT uległ poziom białek ZO1 i ZEB1. 24-godzinna inkubacja komórek SH-SY5Y z EGT w stężeniach 100 µmol/dm³ (p= 0,0415, n= 3) i 200 µmol/dm³ (p= 0,0046, n= 3) spowodowała obniżenie poziomu białka ZEB1. Niższy niż w próbie kontrolnej poziom białka odnotowano także dla białka ZO1, lecz tylko w przypadku EGT w stężeniu 200 µmol/dm³ (p < 0,0001, n= 3). Poziom pozostałych białek poddanych analizie nie uległ zmianie.



Rycina 22. Poziom białek markerowych przejścia EMT w komórkach linii SH-SY5Y suplementowanych EGT w stężeniu 100 lub 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny. Wyniki wyrażono w formie normalizowanej na β -aktynę a następnie na poziom białka w próbie kontrolnej (stąd próba „K” wynosi równe 1). Na wykresach oraz przy zdjęciach membran (K) oznacza próbę kontrolną, (E100) komórki traktowane EGT w stężeniu 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (E200) komórki traktowane EGT w stężeniu 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Wykresy przedstawiają poziom (A) E-kadheryny, (B) β -kateniny, (C) ZEB1, (D) ZO1, (E) Snail, (F) wimentyny. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta ($n=3$).

W celu oceny wpływu EGT na kinazę GSK3 i białka powiązane z GSK3 przeprowadzono analizę poziomu wybranych białek modulujących proces makroautofagii i autofagii zależnej od białek opiekuńczych (Ryc. 23). Analiza densytometryczna wykazała, że EGT nie wpływa

na poziom białek: Hsc70, cdk5, LC3-A i LC3-B. Wykazano indukcję poziomu białka GSK3 α po inkubacji komórek z EGT w stężeniu 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ($p=0,0402$; $n=3$). Wyższy poziom białka względem kontroli wykazano również dla białka mTOR po 24-godzinnej inkubacji z EGT w stężeniu 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ($p=0,038$; $n=3$). Dla wyższego stężenia nie wykazano istotności statystycznej z uwagi na wysoką wartość odchylenia standardowego.



Rycina 23. Poziom wybranych białek w komórkach linii SH-SY5Y suplementowanych EGT w stężeniu 100 lub 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny. Wyniki wyrażono w formie normalizowanej na β -aktynę a następnie na poziom białka w próbie kontrolnej (stąd próba „K”= 1). Na wykresach oraz przy zdjęciach membran (K) oznacza próbę kontrolną, (E100) komórki traktowane EGT w stężeniu 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (E200) komórki traktowane EGT w stężeniu 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Wykresy przedstawiają poziom (A) Hsc70, (B) cdk5, (C) GSK3 α , (D) LC3-A, (E) LC3-B, (F) mTOR, (G) GSK3 β . Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta ($n=3$).

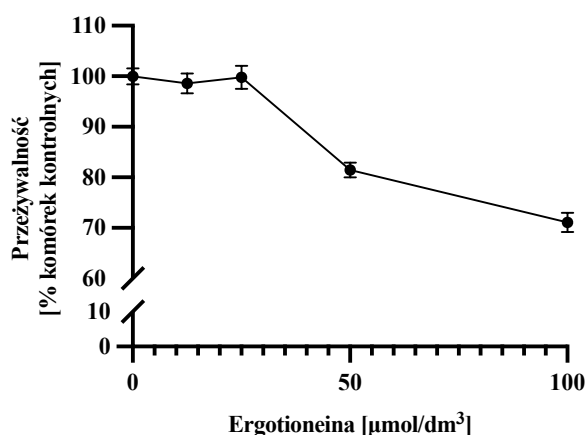
W celu uzyskania kontroli pozytywnej białka GSK3 β komórki inkubowano przez 24 godziny z LiCl w stężeniu 6 mmol/dm^3 . W efekcie poziom białka podniósł się ponad

dwukrotnie względem kontroli negatywnej ($p = 0,027$; $n = 3$). Jednakże nie zaobserwowano efektów działania EGT na poziom białka GSK3 β .

Przeprowadzone eksperymenty na komórkach linii SH-SY5Y sugerują istnienie związku pomiędzy EGT a kinazą mTOR. Pomiary wykazały nie tylko dobrą całkowitą zdolność antyoksydacyjną EGT, ale również zdolność do indukcji poziomu mTOR.

Ocena wpływu ergotioneiny na komórki linii HepG2

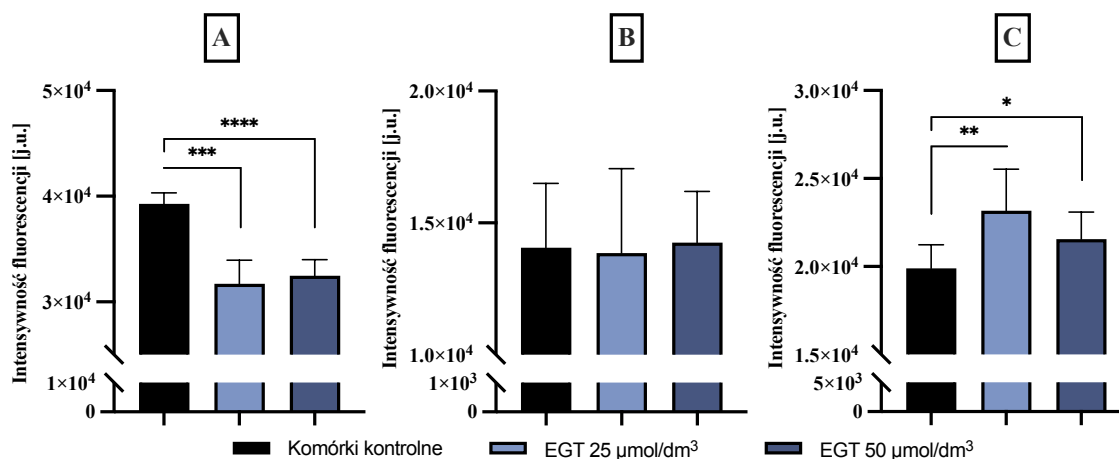
W poniższej części przedstawiono wyniki doświadczeń przeprowadzonych na ludzkich komórkach raka wątrobowokomórkowego linii HepG2.



Rycina 24. Przeżywalność komórek linii HepG2 preinkubowanych z EGT w zakresie stężeń 12,5 – 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono w formie znormalizowanej na kontrolę jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm SEM ($n = 3$).

Przeprowadzono pomiar przeżywalności komórek linii HepG2 traktowanych EGT w zakresie stężeń (12,5 – 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) przez 24 godziny. EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ spowodowała redukcję przeżywalności komórek o 20%, przy czym dwukrotnie wyższe stężenie EGT obniżyło przeżywalność komórek o 30% wartości kontrolnych (Ryc. 24). Z kolei EGT w stężeniach 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ oraz 12,5 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ nie wykazały toksyczności względem komórek HepG2. Kierując się kryterium doboru opartym o stężenia nietoksyczne lub powodujące spadek przeżywalności nie większy niż 20%, do dalszych doświadczeń z udziałem komórek HepG2 wybrano stężenia EGT równe 25 i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

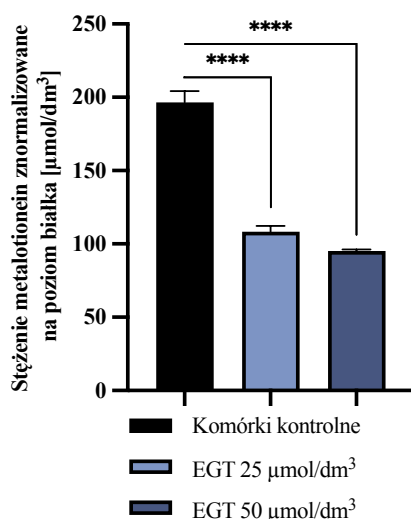
EGT w stężeniu 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ($p = 0,0002$; $n = 6$) i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ($p < 0,0001$; $n = 6$) spowodowała obniżenie generacji RFT wykrywanych z użyciem sondy H₂DCFDA względem wartości kontrolnych w komórkach linii HepG2 (Ryc. 25A). W przypadku komórek SH-SY5Y nie zaobserwowano takiej zależności (Ryc. 7). Pomiar sondą fluorescencyjną DHR123 (Ryc. 25B) nie wykazał różnic generacji nadtlenku wodoru pomiędzy komórkami suplementowanymi EGT a komórkami kontrolnymi.



Rycina 25. Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii HepG2 traktowanych EGT w stężeniach 25 i 50 µmol/dm³ przez 24 godziny. Poziom RFT zmierzono za pomocą następujących sond fluorescencyjnych: (A) H₂DCF-DA, (B) DHR123, (C) DAF-FM. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych ± SD. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta (n= 6).

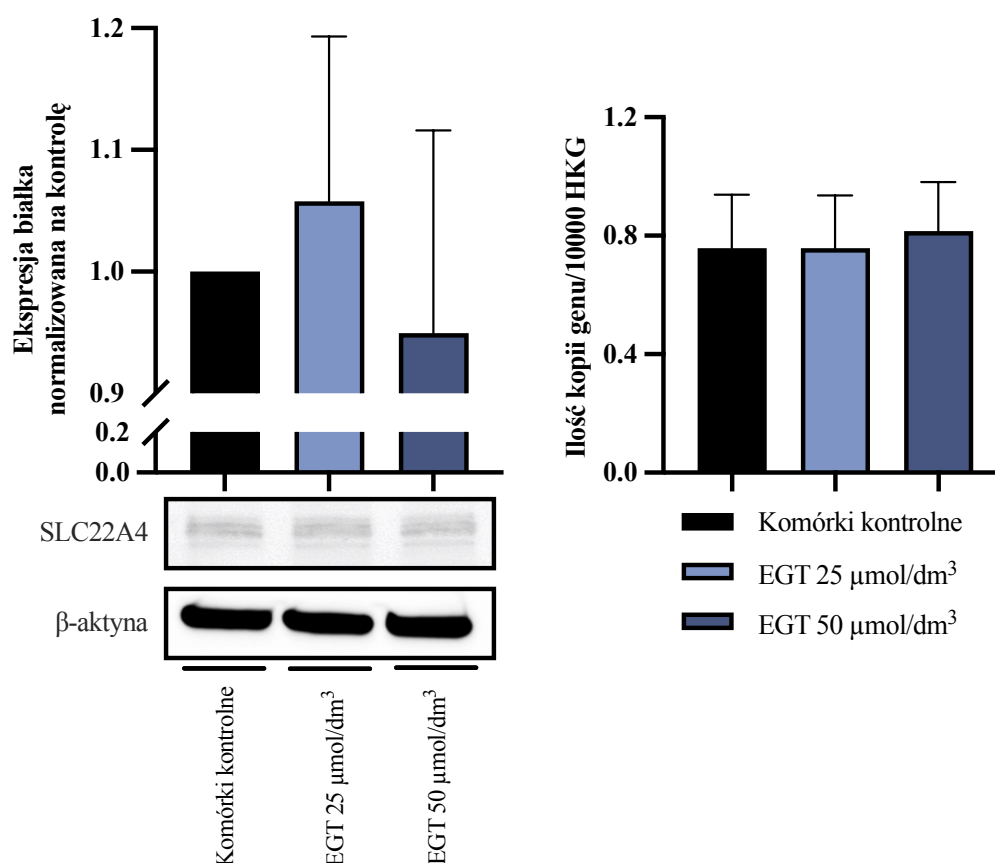
Pomiar poziomu NO (Ryc. 25C) wykazał statystycznie istotny wzrost poziomu NO po inkubacji z EGT w stężeniu 25 µmol/dm³ (p= 0,0024; n= 9) oraz 50 µmol/dm³ (p= 0,0261; n= 9). Dla porównania, komórki SH-SY5Y inkubowane z EGT nie wykazywały wyższego poziomu NO od komórek kontrolnych (Ryc. 7E).

W celu oceny poziomu metalotionein w komórkach linii HepG2 zastosowano metodę pomiarową opartą o odczynnik Ellmana. Na rycinie 26 przedstawiono poziom metalotionein w komórkach HepG2 traktowanych EGT, która w stężeniu 25 µmol/dm³ spowodowała spadek poziomu metalotionein o niespełna 50% względem wartości kontrolnych (p < 0,0001; n= 6). Stężenie EGT równe 50 µmol/dm³ obniżyło poziom metalotionein o ponad 50% (p < 0,0001; n= 6). Analiza statystyczna wykazała zależność poziomu metalotionein od stężenia EGT w komórkach linii HepG2 (p < 0,0001; n= 6).



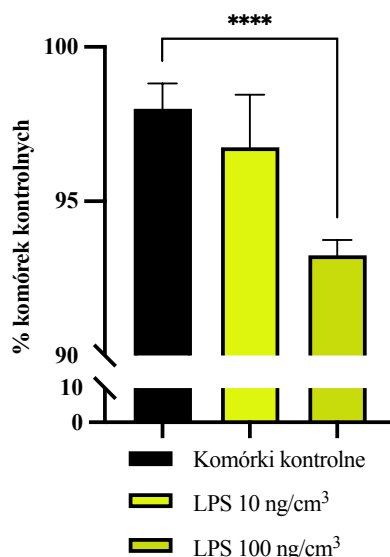
Rycina 26. Poziom metalotionein w komórkach HepG2 traktowanych EGT w stężeniu 25 i 50 µmol/dm³ przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono w formie znormalizowanej na poziom białka w próbach jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych ± SD. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta (n= 6).

Pomiar ekspresji genu *slc22a4* w komórkach HepG2 traktowanych EGT wykazał, że stosowane stężenia EGT nie powodują zmian w ekspresji genu *slc22a4* (Ryc. 27). Jednakże, w porównaniu do komórek SH-SY5Y (Ryc. 15), wartości bazowe ekspresji tego genu są około ośmiokrotnie wyższe w komórkach HepG2. Konstytutywnie obecny w komórkach poziom transportera jest wystarczający do pobrania EGT ze środowiska. Zarówno poziom mRNA jak i poziom białka SLC22A4 nie ulega zmianie po traktowaniu komórek EGT w stężeniu 25 i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.



Rycina 27. Poziom transportera SLC22A4 i ekspresja genu *slc22a4* w komórkach linii HepG2 traktowanych EGT w stężeniu 25 lub 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny. Po lewej stronie przedstawiono poziom białka SLC22A4 znormalizowany na kontrolę ładowania (β -aktynę) a następnie na wartości poziomu białka w próbie kontrolnej. Wykres po prawej stronie przedstawia ilość kopii badanego genu *slc22a4* na 10000 kopii genu referencyjnego (*rpl13a*, *gapdh*). Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm SD. Na rycinie przedstawiono fotografie reprezentatywne wywoływanych membran (ilość wykonanych repetycji doświadczenia $n=4$).

Analiza literaturowa wykazała, że EGT moduluje aktywność receptorów z rodziny TLR w makrofagach [99]. W celu modulacji szlaku zależnego od TLR4 zastosowano lipopolisacharyd (LPS), którym traktowano komórki HepG2 preinkubowane z EGT [100].

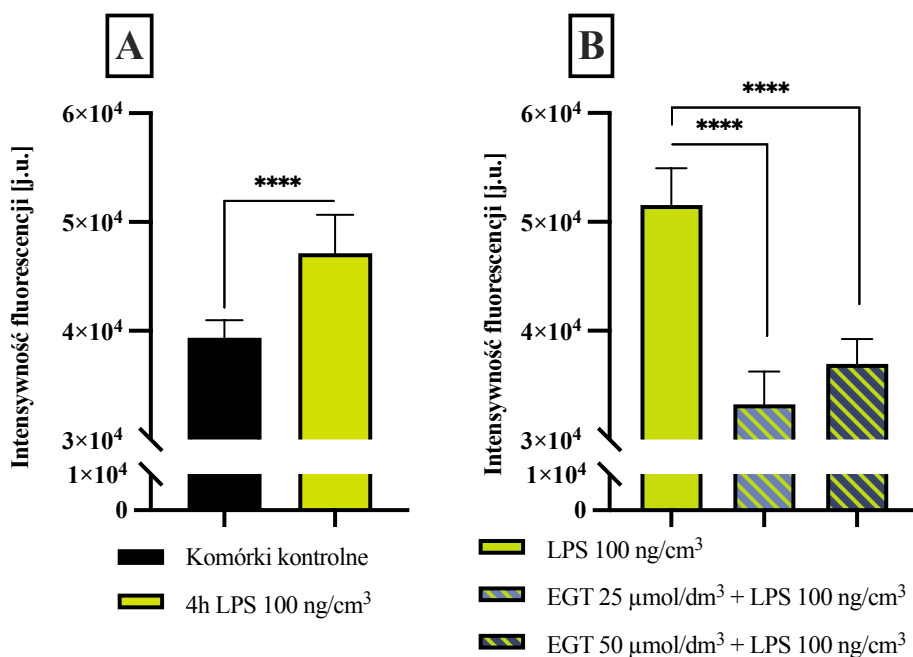


Rycina 28. Przeżywalność komórek linii HepG2 traktowanych LPS w dwóch stężeniach (10 i 100 ng/cm³) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych ± SD. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta (n= 6).

Na podstawie literatury przedmiotu dobrano najczęściej wykorzystywane w układach komórkowych stężenia LPS i zweryfikowano ich toksyczność względem prowadzonej hodowli komórek linii HepG2. Komórki poddano 24-godzinnej inkubacji z roztworem LPS w stężeniu 10 lub 100 ng/cm³ (Ryc. 28). Pomiar przeżywalności wykazał niewielki wpływ wyższego stężenia LPS na przeżywalność komórek linii HepG2 ($p < 0,0001$, $n = 6$). Natomiast niższe stężenie LPS nie spowodowało spadku przeżywalności komórek. Do dalszych doświadczeń wybrano stężenie 100 ng/cm³.

W celu oceny antyoksydacyjnych właściwości EGT podczas indukcji stresu oksydacyjnego przez LPS przeprowadzono pomiar generacji RFT/RFA.

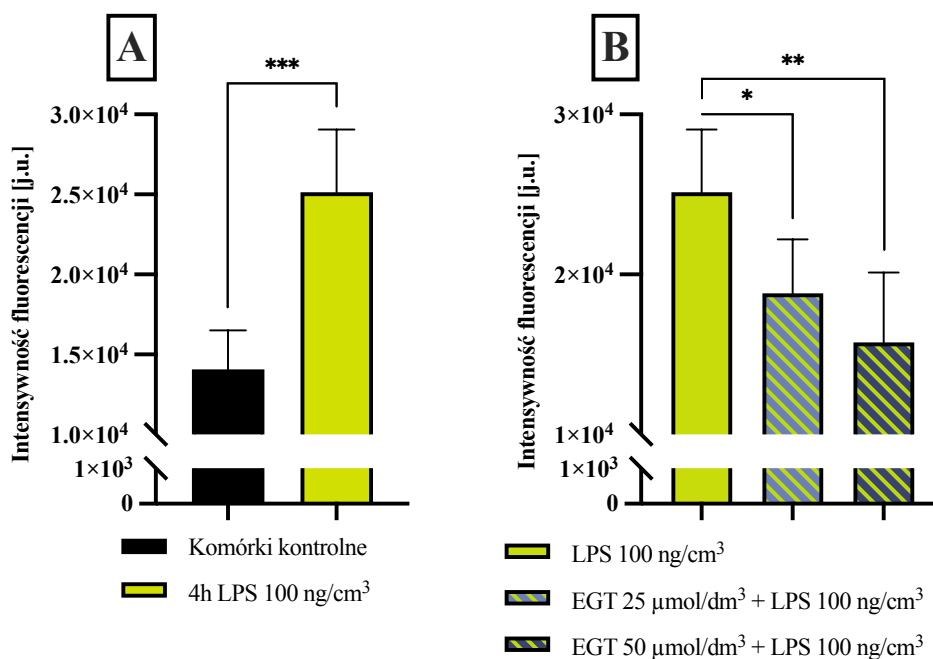
Optymalizacja metody wykazała, że generacja RFT jest największa po upływie czterech godzin inkubacji z LPS-em, dlatego zdecydowano o skróceniu czasu inkubacji z czynnikiem stresowym do czterech godzin. Pomiar całkowitego poziomu RFT za pomocą sondy H₂DCF-DA wykazał, że LPS po czterech godzinach inkubacji istotnie zwiększa poziom RFT w komórkach HepG2 ($p < 0,0001$, $n = 5$) (Ryc. 29A). Komórki preinkubowano przez 24 godziny z EGT w stężeniu 25 lub 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i traktowano LPS-em przez cztery godziny w warunkach standardowych (Ryc. 29B). Pomiar poziomu RFT wykazał, że preinkubacja z EGT chroni komórki przed generacją RFT indukowaną przez LPS ($p < 0,0001$, $n = 5$). Stężenia 25 i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ równie wydajnie chronią komórki przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez LPS ($p = 0,0601$, $n = 5$).



Rycina 29. Pomiar ilościowy poziomu reaktywnych form tlenu przy użyciu sondy fluorescencyjnej H₂DCF-DA w komórkach linii HepG2. (A) Komórki traktowano roztworem LPS w stężeniu końcowym 100 ng/cm³ przez cztery godziny. (B) Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu 25 lub 50 μmol/dm³ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 4 godziny roztworem LPS w stężeniu końcowym 100 ng/cm³. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji.

LPS (Ryc. 29B) nie moduluje generacji RFT regulowanej przez preinkubację komórek z EGT w stężeniu 25 μmol/dm³ (Ryc. 25A) ($p=0,383$, $n=5$). Natomiast inkubacja komórek z LPS (Ryc. 29B) moduluje poziom RFT regulowany przez EGT o stężeniu 50 μmol/dm³ ($p=0,0064$, $n=5$). Interesujący jest fakt, że traktowanie LPS-em komórek preinkubowanych z EGT prowadzi do redukcji poziomu RFT względem komórek, których LPS-em nie traktowano. Sugeruje to, że LPS aktywuje wewnątrzkomórkowe systemy obrony antyoksydacyjnej.

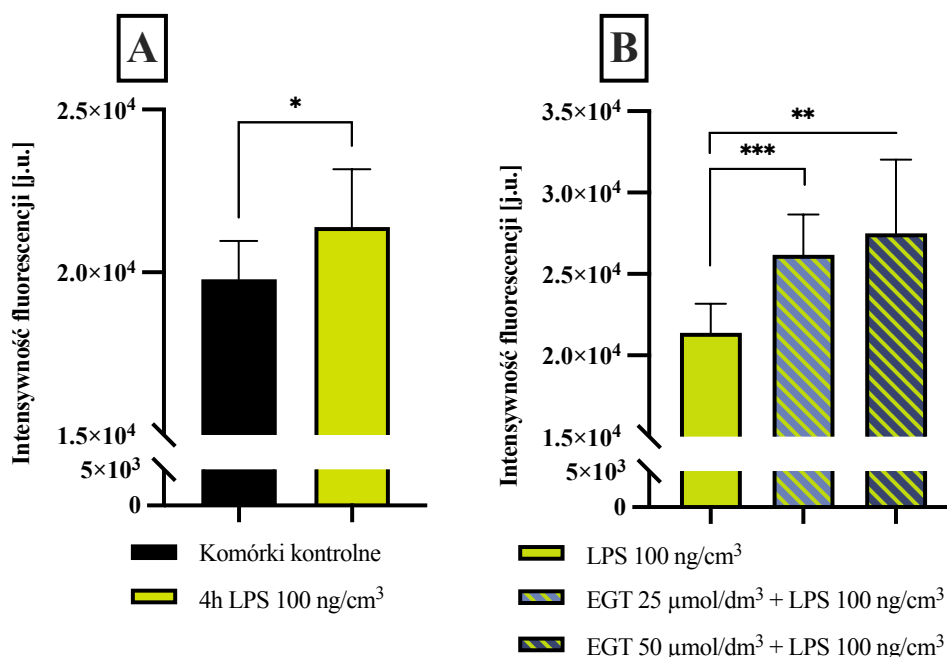
Następnie oceniono generację H₂O₂ z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej DHR123 w komórkach preinkubowanych z EGT i traktowanych LPS-em (Ryc. 30). Pomiaru fluorymetryczne wykazały, że czterogodzinna inkubacja komórek z LPS-em powoduje istotny wzrost poziomu H₂O₂ względem komórek kontrolnych ($p=0,0007$, $n=5$) (Ryc. 30A). 24-godzinna preinkubacja komórek z EGT w stężeniu 25 μmol/dm³ wywołała istotny spadek poziomu H₂O₂ po traktowaniu LPS-em w porównaniu do komórek kontrolnych rozumianych jako komórki inkubowane z samym LPS ($p=0,0255$, $n=5$) (Ryc. 30B).



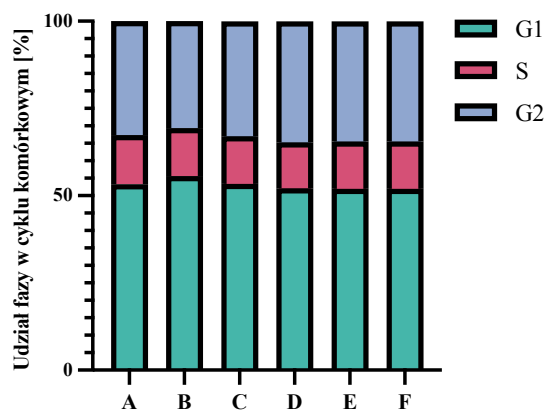
Rycina 30. Pomiar poziomu nadtlenu wodoru przy użyciu sondy fluorescencyjnej DHR123 w komórkach linii HepG2. (A) Komórki traktowano lipopolisacharydem w stężeniu końcowym 100 ng/cm³ przez cztery godziny. (B) Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu 25 lub 50 µmol/dm³ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 4 godziny lipopolisacharydem w stężeniu końcowym 100 ng/cm³. Dane przedstawiające wpływ ergotioneiny na komórki HepG2 zmierzony sondą DHR123 znajdują się na rycinie 17. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji.

Hodowla komórek preinkubowana z wyższym stężeniem EGT (50 µmol/dm³) wykazała obniżenie poziomu H₂O₂ (Ryc. 25B) (p= 0,0072, n= 5). Analiza statystyczna nie wykazała różnic pomiędzy generacją H₂O₂ w komórkach inkubowanych z różnymi stężeniami EGT (p= 0,247, n= 5). Komórki inkubowane przez 24 godziny z EGT nie wykazują podwyższonego poziomu H₂O₂ (Ryc. 25B).

LPS po czterech godzinach inkubacji powoduje generację NO w komórkach HepG2 (p= 0,0377, n= 5) (Ryc. 31A). Preinkubacja komórek z EGT zarówno w stężeniu 25 µmol/dm³ (p= 0,0002, n= 5) jak i 50 µmol/dm³ (p= 0,0017, n= 5) wzmacnia efekt generacji NO w komórkach HepG2 (Ryc. 31B). Analiza statystyczna nie wykazała zależności pomiędzy generacją NO a stężeniem EGT (p= 0,4549, n= 5). Po porównaniu generacji NO w komórkach inkubowanych wyłącznie z EGT (Ryc. 25C) a komórkach traktowanych również LPS-em (Ryc. 31B) wynika, że czterogodzinne traktowanie komórek LPS-em istotnie zwiększa poziom NO w komórkach preinkubowanych z EGT w stężeniu 25 µmol/dm³ (p= 0,0181, n= 5) i 50 µmol/dm³ (p= 0,0019, n= 5).



Rycina 31. Pomiar poziomu tlenu azotu przy użyciu sondy fluorescencyjnej DAF-FM w komórkach linii HepG2. (A) Komórki traktowano roztworem lipopolisacharydu w stężeniu końcowym 100 ng/cm³ przez cztery godziny. (B) Komórki preinkubowano z EGT w stężeniu 25 lub 50 µmol/dm³ przez 24 godziny w warunkach standardowych, a następnie traktowano przez 4 godziny roztworem lipopolisacharydu w stężeniu końcowym 100 ng/cm³. Dane przedstawiające wpływ ergotioneiny na komórki HepG2 zmierzony sondą DAF-FM znajdują się na rycinie 17. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SD w jednostce umownej intensywności fluorescencji.

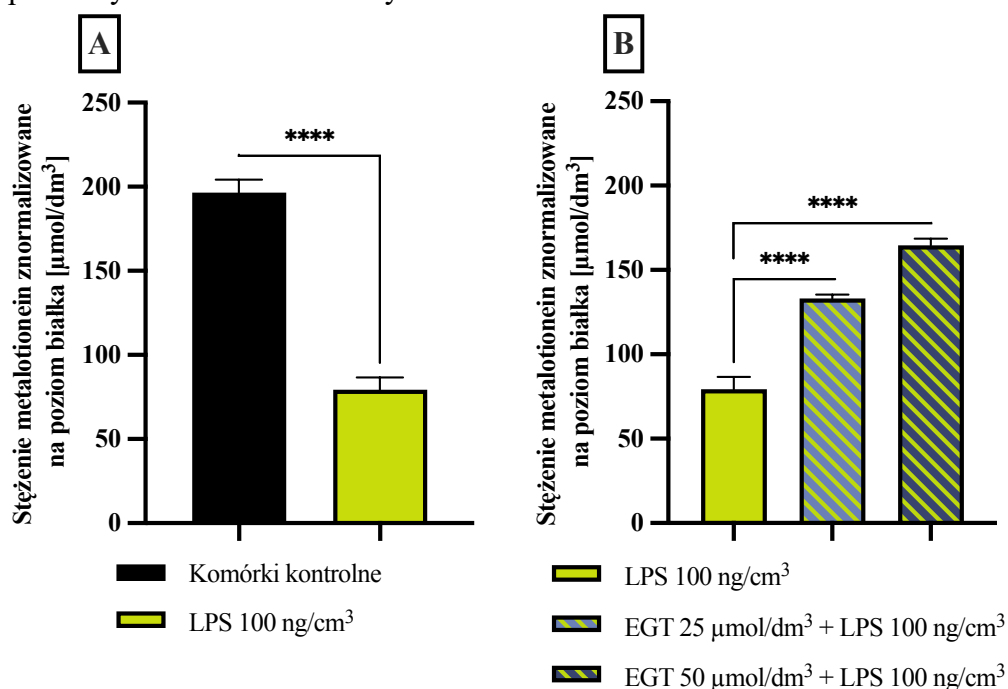


Rycina 32. Rozkład faz cyklu komórkowego w komórkach linii HepG2 po 24-godzinnej preinkubacji z ergotioneiną w dwóch stężeniach (25 lub 50 µmol/dm³) i 24-godzinnej inkubacji z roztworem lipopolisacharydu w stężeniu 100 ng/cm³. (A) Komórki kontrolne; (B) Komórki traktowane EGT w stężeniu 25 µmol/dm³; (C) Komórki traktowane EGT w stężeniu 50 µmol/dm³; (D) Komórki traktowane LPS w stężeniu 100 ng/cm³; (E) Komórki preinkubowane 24 godziny z EGT w stężeniu 25 µmol/dm³ i traktowane 24 godziny LPS w stężeniu 100 ng/cm³; (F) Komórki preinkubowane 24 godziny z EGT w stężeniu 50 µmol/dm³ i traktowane 24 godziny LPS w stężeniu 100 ng/cm³. Wyniki przedstawiono jako udział procentowy komórek występujących w danej fazie cyklu komórkowego względem całości zmierzonej próby. Na wykresie przedstawiono wyniki reprezentatywne cyklu pomiarów cytofluorymetrycznych.

Przedstawione powyżej wyniki sugerują, że w komórkach HepG2 pod wpływem działania EGT i LPS zachodzi zaburzenie równowagi redoks, co może wpływać na przebieg cyklu komórkowego. W celu oceny zdolności EGT do modulacji rozkładu faz cyklu komórkowego przeprowadzono analizę cytofluorymetryczną komórek (Ryc. 32).

Wykonane eksperymenty sugerują, że EGT i LPS nie wpływają na przesunięcie faz cyklu komórkowego. Zastosowanie preinkubacji z EGT i następnie traktowanie komórek LPS-em również nie spowodowały widocznych zmian w rozkładzie faz cyklu komórkowego. Pomimo modulacji poziomu RFT i RFA, endogennych metalotionein i przeżywalności komórek, EGT nie wykazuje zdolności do modulacji cyklu komórkowego w komórkach linii HepG2.

Przeprowadzone doświadczenia dostarczyły wyników sugerujących, że LPS poprzez modulację poziomu RFT może powodować zmianę poziomu metalotionein w komórkach HepG2. Wyniki zestawiono na rycinie 33.

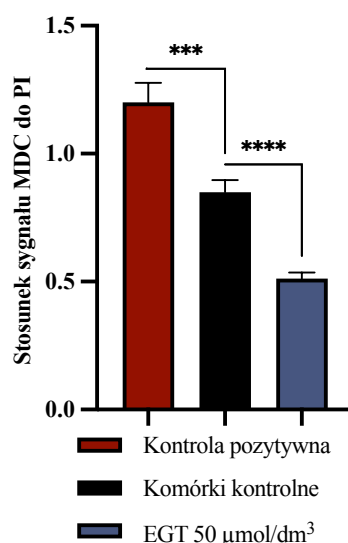


Rycina 33. Stężenie endogennych metalotionein w komórkach HepG2 preinkubowanych z ergotioneiną w stężeniu 25 lub 50 $\mu\text{mol/dm}^3$ i traktowanych LPS w stężeniu 100 ng/cm^3 . (A) poziom metalotionein w komórkach kontrolnych i komórkach traktowanych LPS-em; (B) poziom metalotionein w komórkach traktowanych LPS-em oraz komórkach preinkubowanych z ergotioneiną i traktowanych LPS-em. Wartości stężenia metalotionein wyliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej stężenia glutationu. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta.

Inkubacja komórek HepG2 z LPS (Ryc. 33A) przez 24 godziny spowodowała obniżenie stężenia metalotionein o 117,36 $\mu\text{mol/dm}^3$ względem kontroli ($p < 0,0001$, $n = 3$).

Preinkubacja komórek z EGT w stężeniu 25 lub 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (Ryc. 33B) zmniejszyła poziom metalotionein w komórkach spowodowany traktowaniem LPS-em (dla obu stężeń $p < 0,0001$; $n= 3$).

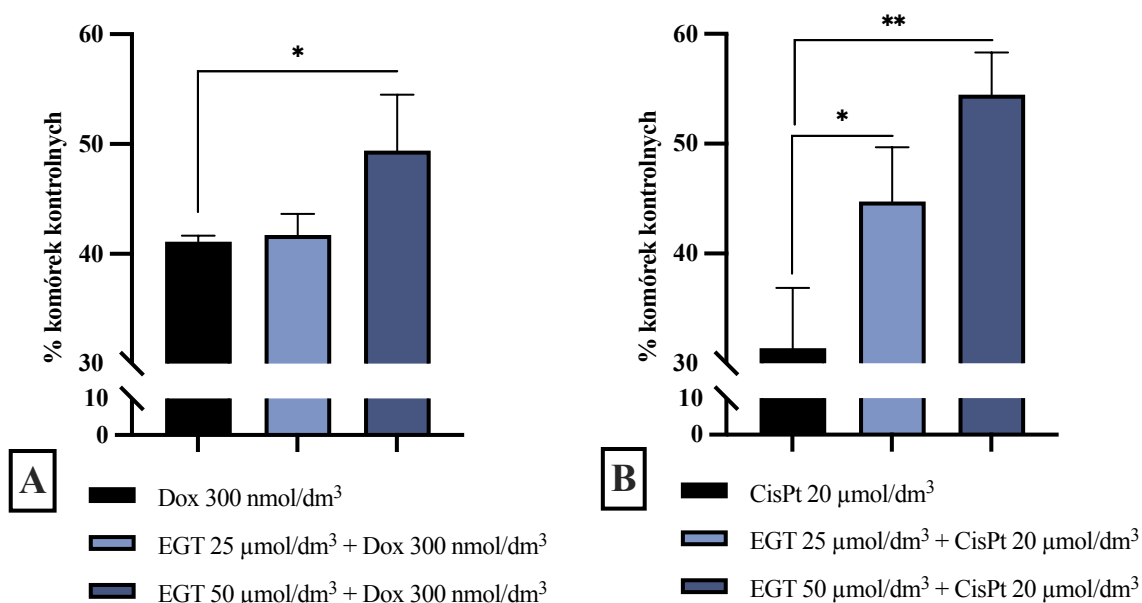
Komórki HepG2 inkubowano przez 24 godziny w pożywce hodowlanej niesuplementowanej FBS w celu indukcji autofagii (Ryc. 34). Analiza wyników wykazała, że deprywacja surowicza w komórkach HepG2 powoduje indukcję autofagii ($p= 0,0004$; $n= 8$). Traktowanie komórek EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny spowodowało spadek akumulacji MDC ($p < 0,0001$; $n= 8$), co sugeruje mniejszą ilość wakuol autofagowych w komórkach.



Rycina 34. Ocena modulacji procesu autofagii przez ergotioneinę w komórkach HepG2. Komórki traktowano ergotioneiną w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przez 24 godziny. W celu uzyskania kontroli pozytywnej indukcji autofagii, komórki inkubowano przez 24 godziny w pożywce niezawierającej surowicy. Wyniki przedstawiono jako wartości średnich arytmetycznych wyników cząstkowych \pm SEM. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta.

Inkubacja komórek HepG2 z LPS powoduje indukcję receptora TLR4 [101]. Ponadto, jak donoszą Hsiao i wsp. [101], traktowanie komórek chemioterapeutykami jak dokсорubicyna czy cisplatyna prowadzi do represji aktywności TLR4. Aby sprawdzić wpływ EGT na hepatocyty poddane działaniu leków przeciwnowotworowych, przeprowadzono doświadczenie, w którym komórki linii HepG2 traktowano różnymi lekami: dokсорubicyną, metotreksatem, mitoksantronem, winkrystyną, etopozydem i cisplatyną. Spośród panelu wybranych chemioterapeutyków tylko przy traktowaniu komórek dokсорubicyną (Dox) lub cisplatyną (CisPt) odnotowano modulację przeżywalności indukowaną przez EGT (Ryc. 35). 72-godzinna inkubacja komórek HepG2 z Dox w stężeniu 300 nmol/dm^3 spowodowała spadek przeżywalności hodowli do 40%

wartości próby kontrolnej (Ryc. 35A). Preinkubacja komórek z EGT w stężeniu 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ nie wpłynęła na cytotoksyczność Dox, podczas gdy EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przyczyniła się do zwiększenia przeżywalności komórek o około 10% względem komórek niepreinkubowanych z EGT ($p=0,0485$; $n=6$). Z kolei CisPt w stężeniu 20 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ zredukowała przeżywalność hodowli do 30% wartości próby kontrolnej po 72 godzinach inkubacji (Ryc. 35B). Preinkubacja komórek z EGT w stężeniu 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ zmniejszyła toksyczne działanie CisPt o 15% ($p=0,0348$; $n=6$) podczas gdy EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ o około 25% próby nieinkubowanej z EGT ($p=0,004$; $n=6$).

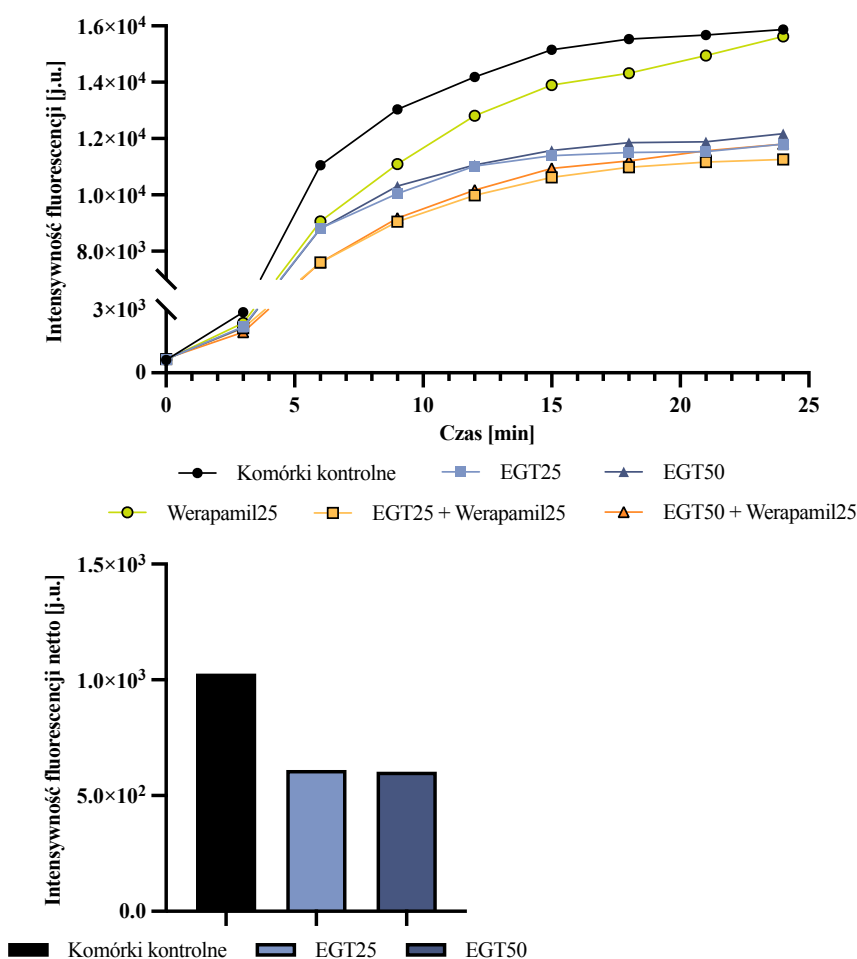


Rycina 35. Przeżywalność komórek linii HepG2 preinkubowanych 24 godziny z ergotioneiną w stężeniach 25 i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i traktowanych przez 72 godziny (A) doksorubicyną (Dox) w stężeniu 300 nmol/dm³ lub (B) cisplatyną (CisPt) w stężeniu 20 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Wyniki znormalizowano na wartości kontrolne i wyrażono jako udział procentowy komórek kontrolnych \pm odchylenie standardowe. Istotność statystyczną wyliczono testem t-Studenta.

Oporność komórek na terapię lekami przeciwnowotworowymi zależy również od aktywności i poziomu białek odpowiedzialnych za eksport ksenobiotyków. Białka przyczyniające się do powstawania zjawiska oporności wielolekowej (multidrug resistance, MDR) należą do rodziny ABC. Sprawdzone zdolność EGT do modulacji aktywności wybranych transporterów ABC przy użyciu testów funkcjonalnych.

Komórki poddawano działaniu estrów kalceiny, fluo-3 i BCECF, barwników fluorescencyjnych do oceny aktywności transporterów ABCB1 i ABCC1.

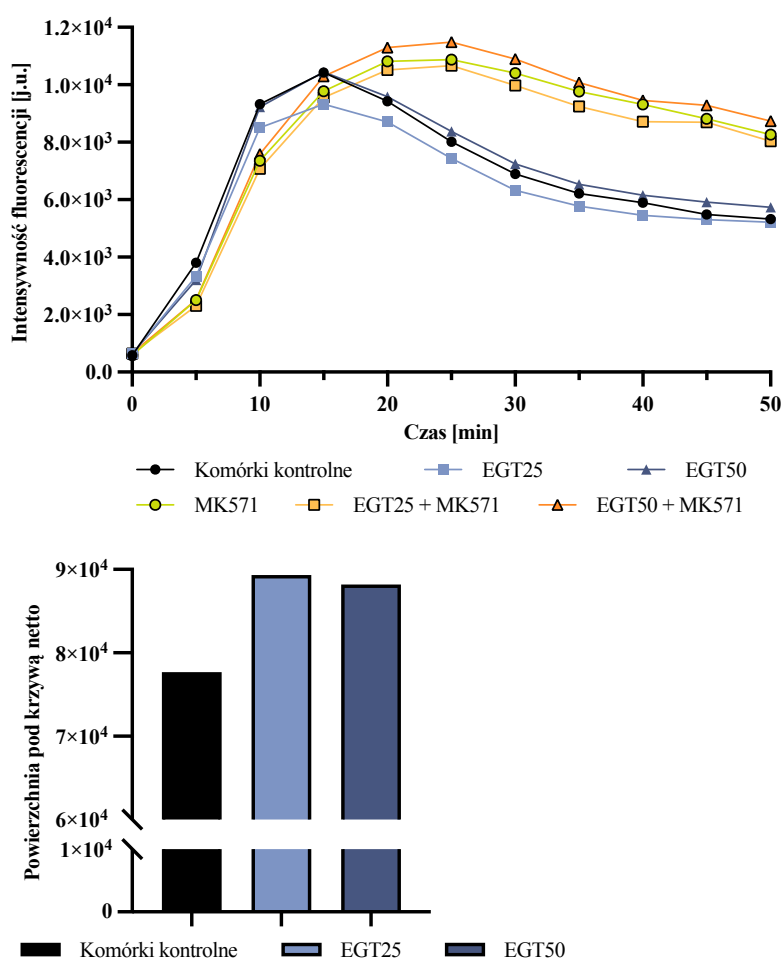
Komórki HepG2 traktowane EGT wykazywały słabszą akumulację kalceiny w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 36). Po upływie sześciu minut inkubacji z kalceiną odnotowano różnicę w szybkości akumulacji barwnika pomiędzy komórkami kontrolnymi a komórkami inkubowanymi z EGT. Inkubacja hodowli z werapamillem spowodowała obniżenie intensywności fluorescencji względem komórek kontrolnych, co jest równoznaczne z niższym wewnątrzkomórkowym stężeniem kalceiny. EGT wzmocniła efekt wywołany przez werapamil, redukując intensywność fluorescencji względem komórek inkubowanych z werapamilem.



Rycina 36. Kinetyka akumulacji kalceiny w komórkach linii HepG2 w zależności od czasu inkubacji. Pomiar cytofluorymetryczny wykonywano co trzy minuty od momentu dodania barwnika bądź barwnika z inhibitorem do zawiesiny komórek aż do pełnego wysycenia komórek barwnikiem. Komórki preinkubowano przez 24 godziny z ergotoneiną w stężeniu 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (EGT25) lub 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (EGT50). Werapamil w stężeniu końcowym 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ dodawano do zawiesiny komórek na pięć minut przed pierwszym pomiarem. Pomiar w czasie 0 wykonywany był niezwłocznie po dodaniu roztworu barwnika w pełnym medium do zawiesiny komórek. Wyniki przedstawiono w postaci mediany z 10000 wewnątrzkomórkowych pomiarów fluorescencji. Wykres słupkowy przedstawia intensywność fluorescencji netto. Przedstawiono wyniki reprezentatywne.

Równowaga stężeniowa kalceiny ustaliła się po około 20 minutach inkubacji z barwnikiem. Wartość intensywności fluorescencji netto dla komórek traktowanych EGT była niższa od wartości kontrolnych, co może sugerować wyższą aktywność transportera ABCB1 lub większą ilość tego transportera w błonie komórkowej.

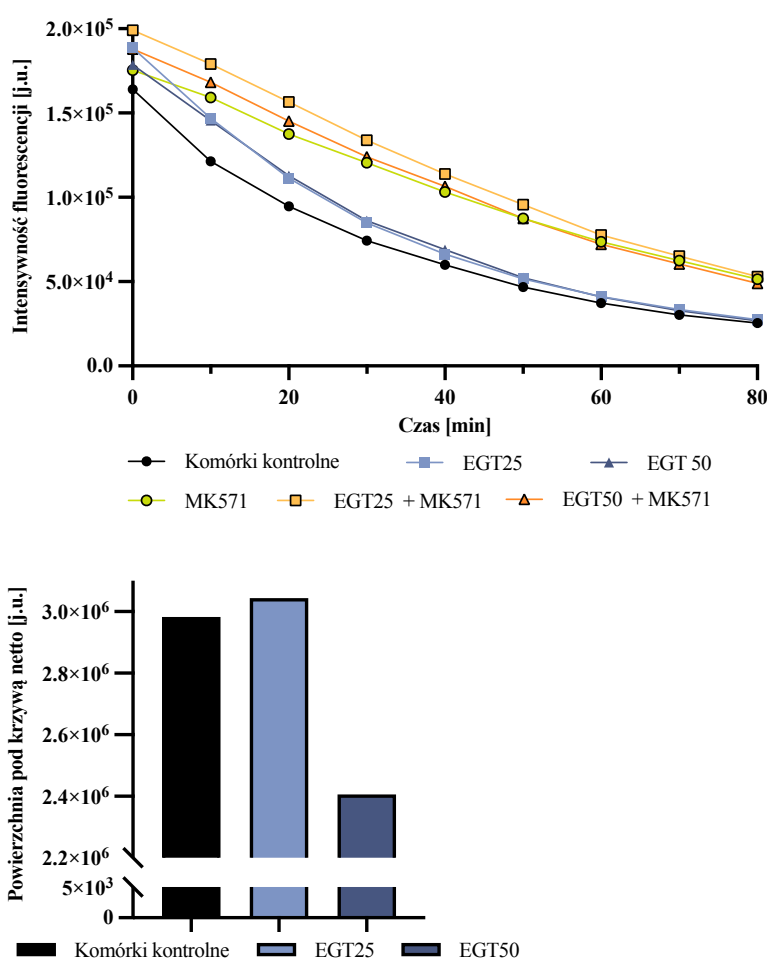
Pomiar funkcjonalny aktywności transportera ABCC1 (ABCC1 – multidrug resistance-associated protein 1) przeprowadzono z wykorzystaniem metody pomiaru kinetyki akumulacji i wpływu barwnika Fluo-3AM. Maksimum fluorescencji w próbach bez inhibitora MK571 osiągnięto po 15 minutach inkubacji z barwnikiem.



Rycina 37. Kinetyka akumulacji i wpływu Fluo-3 AM w komórkach linii HepG2 w zależności od czasu inkubacji. Pomiar cytofluorymetryczny wykonywano co pięć minut przez 50 minut od momentu dodania barwnika bądź barwnika z inhibitorem do zawiesiny komórek. Komórki preinkubowano przez 24 godziny z ergotioneiną w stężeniu 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (EGT25) lub 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (EGT50). MK571 w stężeniu końcowym 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ dodawano do zawiesiny komórek na pięć minut przed pierwszym pomiarem. Pomiar w czasie 0 wykonywany był niezwłocznie po dodaniu roztworu barwnika w pełnym medium do zawiesiny komórek. Wyniki przedstawiono w postaci mediany z 10000 wewnątrzkomórkowych pomiarów fluorescencji. Wykres słupkowy przedstawia powierzchnię pod krzywą netto. Przedstawiono wyniki reprezentatywne.

Komórki inkubowane z inhibitorem MK571 osiągnęły maksimum fluorescencji w 25 minucie inkubacji (Ryc. 37). W komórkach inkubowanych w obecności inhibitora znacznie wolniej następował wypływ barwnika. Dowodzi to, że transporter ABCC1 uległ częściowej inhibicji przez interakcję z MK571. Suplementacja komórek ergotioneiną spowodowała modulację wartości powierzchni pod krzywą netto względem komórek kontrolnych.

Kinetyka wypływu sondy BCECF wykazała (Ryc. 38), że preinkubacja komórek linii HepG2 z EGT przyczynia się do wydajniejszej akumulacji barwnika ze środowiska względem komórek kontrolnych (wartość pomiaru w czasie $t=0$ min).

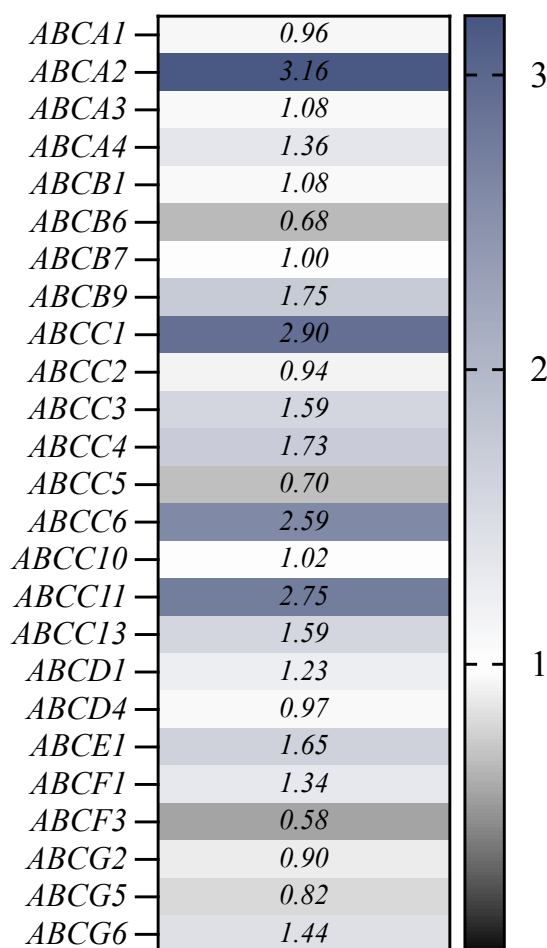


Rycina 38. Kinetyka wypływu BCECF w komórkach linii HepG2 w zależności od czasu inkubacji. Pomiar cytofluorymetryczny wykonywano co 10 minut przez 80 minut od momentu dodania barwnika bądź barwnika z inhibitorem do zawiesiny komórek. Komórki preinkubowano przez 24 godziny z EGT w stężeniu 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (EGT25) lub 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (EGT50). Zastosowano inhibitor MK571 w stężeniu końcowym 25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Pomiar rozpoczęto niezwłocznie po dodaniu roztworu barwnika w pełnym medium do zawiesiny komórek. Wyniki przedstawiono w postaci mediany z 10000 wewnątrzkomórkowych pomiarów fluorescencji. Wykres słupkowy przedstawia powierzchnię pod krzywą netto. Przedstawiono wyniki reprezentatywne.

Odnotowano również bardziej efektywny wpływ sondy BCECF z komórek traktowanych EGT, pomimo wyższych bazowych wartości fluorescencji. Komórki traktowane inhibitorem MK571 wykazywały zbliżoną zależność a zastosowanie inhibitora MK571 przyczyniło się do znacznego spowolnienia wypływu barwnika z wnętrza komórek.

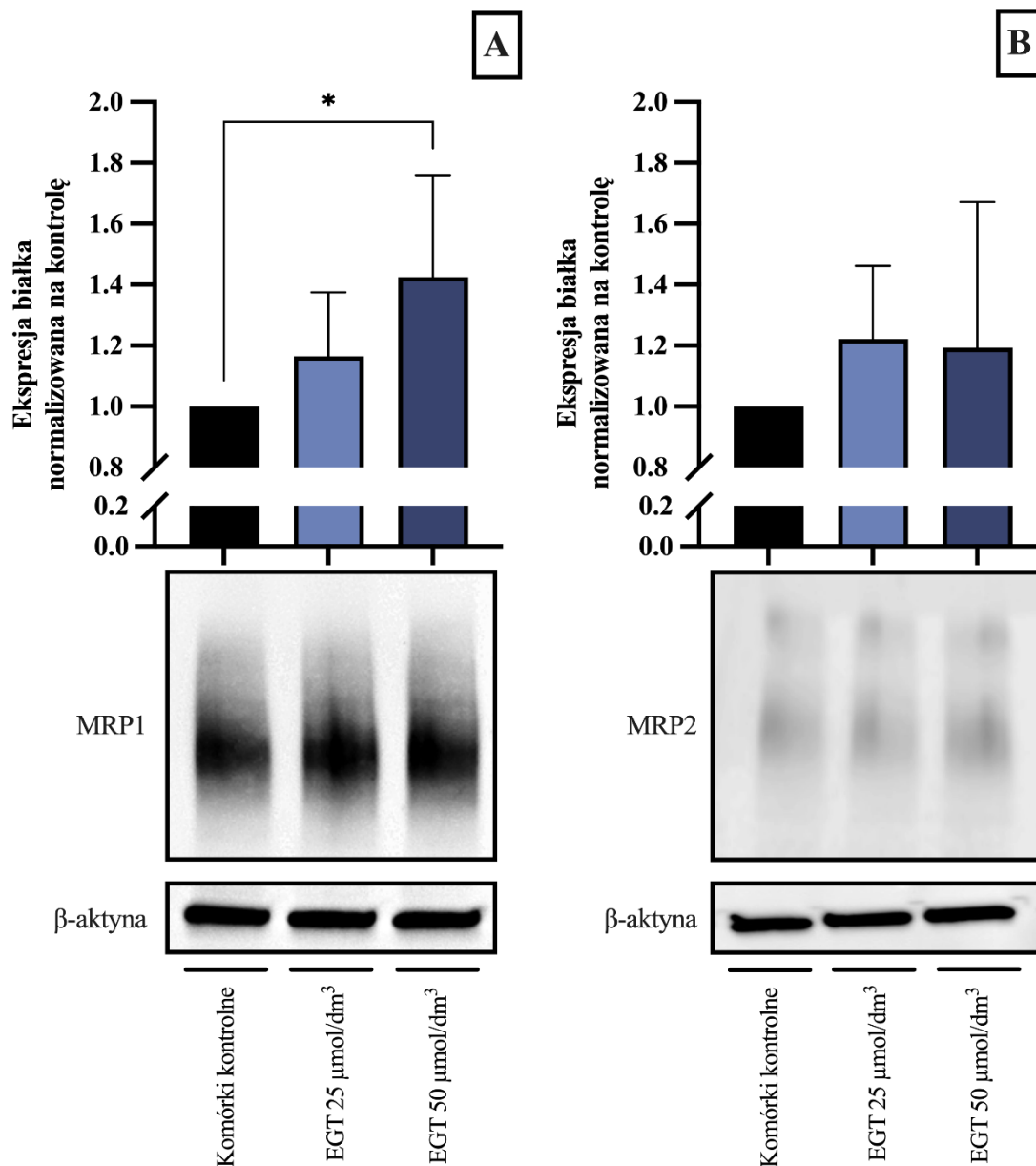
Uzyskane wyniki sugerują, że EGT posiada zdolność do modulacji aktywności lub poziomu transporterów z rodziny ABC.

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w testach funkcjonalnych, wykonano doświadczenia metodą qPCR. Ze wszystkich przedstawionych na rycinie 38 genów najwyższej ekspresji względem kontroli uległy *ABCA2*, *ABCC1*, *ABCC6* i *ABCC11*. EGT spowodowała również inhibicję niektórych z badanych genów: *ABCB6*, *ABCC5* i *ABCF3*. Poziom ekspresji pozostałych badanych genów nie uległ zmianie po traktowaniu EGT.



Rycina 39. Heatmapa ekspresji genów kodujących transportery ABC w komórkach linii HepG2 traktowanych ergotoneiną w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Wyniki przedstawiono w formie wielokrotności zmiany względem komórek kontrolnych. N= 3

Analiza poziomu białek ABCC1 i ABCC2 wykazała zwiększony poziom białka ABCC1 (Ryc. 40A) w komórkach linii HepG2 traktowanych EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ($p=0,0445$; $n=3$). Istotności statystycznej nie wykazano natomiast dla niższego stężenia EGT. Nie wykazano różnic w poziomie białka ABCC2 pomiędzy próbkami preinkubowanymi z EGT a próbą kontrolną (Ryc. 40B).



Rycina 40. Poziom białek ABCC1 i ABCC2 w komórkach linii HepG2 traktowanych ergotioneiną przez 24 godziny. (A) poziom białka ABCC1, (B) poziom białka ABCC2. Na wykresach przedstawiono dane znormalizowane na wartości kontrolne w postaci wartości średnich arytmetycznych z trzech powtórzeń ($n=3$) \pm SD. Pomiar densytometryczny przeprowadzono metodą rolling ball. Fotografije przedstawiają wykadrowane części wywołanych membran zawierające badane białko i kontrolę ładowania – β -aktynę.

Uzyskane przeze mnie dane sugerują, że EGT w komórkach linii SH-SY5Y i HepG2 wykazuje nie tylko działanie antyoksydacyjne, ale także działanie o charakterze sygnalizacyjnym i regulacyjnym.

W przeprowadzonych doświadczeniach EGT wykazuje dobre zdolności antyoksydacyjne. Z uwagi na występowanie ugrupowania tiomocznikowego na pierścieniu imidazolowym, nie ulega reakcjom charakterystycznym dla tioli. Nie ulega także reakcji z jonami chromu, której ulega AA. Zachowuje wydajność antyoksydacyjną w kwasowym pH.

W układzie komórkowym EGT wykazuje działanie cytoprotekcyjne. EGT chroni przed śmiercią komórek indukowaną przez H_2O_2 , NO oraz nadtlenkami organicznymi. Suplementacja komórek SH-SY5Y EGT w stężeniach 25-50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ nie powoduje generacji RFT. EGT zmiata RFT generowane traktowaniem H_2O_2 , ale wzmacnia generację RFT indukowaną przez DETA. Preinkubacja z EGT osłabia generację $O_2^{\cdot-}$ indukowaną przez MD w cytozolu i mitochondriach. Zastosowanie 24-godzinnej preinkubacji z EGT prowadzi do wzmocnienia powstawania nadtlenku wodoru w wyniku działania AAPH i DETA. EGT nie wpływa na generację NO niezależnie od zastosowanej substancji o działaniu utleniającym w komórkach SH-SY5Y.

EGT w stężeniu 75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ nie powoduje indukcji apoptozy w komórkach SH-SY5Y. Preinkubacja z EGT istotnie zapobiega indukcji apoptozy przez nadtlenek wodoru i AAPH. Efekt antyapoptotyczny EGT jest mniej wydajny względem DETA lub MD w komórkach SH-SY5Y. Traktowanie komórek chlorkiem litu prowadzi do indukcji apoptozy. EGT ($\geq 200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) wpływa na poziom ATP w komórkach. Nie prowadzi do modulacji cyklu komórkowego. EGT obniża endogenny poziom wakuol autofagowych w komórkach SH-SY5Y oraz moduluje maksymalny poziom fosforylacji białka GSK3 β (Ser9) a także spowalnia jego defosforylację. Podobny trend odnotowuje się w przypadku fosforylacji białka ULK1 w pozycji Ser758. Inkubacja komórek z EGT prowadzi do obniżenia poziomu białek ZEB1 i ZO1 a także indukcji poziomu białek mTOR i GSK3 α .

Komórki HepG2 wykazują większą śmiertelność w odpowiedzi na działanie EGT niż SH-SY5Y. W stężeniach 25 i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ EGT prowadzi do obniżenia generacji endogennego poziomu RFT. Przyczynia się także do wzmożenia generacji NO, czego nie obserwuje się na komórkach SH-SY5Y. EGT wpływa na modulację poziomu wewnątrzkomórkowych metalotionein. W stosowanych stężeniach, EGT nie powoduje indukcji syntezy transportera SLC22A4.

EGT obniża generację nadtlenu wodoru indukowaną przez LPS. EGT wykazuje również wzmocnienie generacji NO indukowanej przez LPS. Preinkubacja z EGT zapobiega indukowanemu przez LPS obniżeniu endogennego poziomu metalotionein. Podobnie jak w komórkach SH-SY5Y, EGT również prowadzi do obniżenia endogennego poziomu wakuol autofagowych w komórkach HepG2. Preinkubacja z EGT w stężeniu $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ chroni komórki przed działaniem doksorubicyny i cisplatyny. EGT moduluje kinetykę akumulacji kalceiny, fluo-3 i BCECF w komórkach HepG2. Gen kodujący transporter ABCC1 ulega nadekspresji względem komórek kontrolnych po inkubacji z komórek z EGT. Zmiany te widoczne są również na poziomie białka.

VII. Dyskusja

Pierwsze doniesienia o antyoksydacyjnych właściwościach ergotioneiny (EGT) opublikowano ponad 70 lat temu [102]. W celu porównania i poszerzenia dostępnej wiedzy na temat właściwości antyoksydacyjnych EGT, przeprowadzono pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej tego związku. Wykorzystano dwie metody oceny zdolności antyoksydacyjnej: metodę redukcji kationorodnika ABTS i metodę FRAP. Pierwsza z metod wykazała, że w warunkach bezkomórkowych EGT jest równie wydajnym antyoksydantem co troloks (Ryc. 3). W porównaniu do innych antyoksydantów, EGT wykazuje działanie antyoksydacyjne porównywalne do kwasu moczowego (UA), choć słabsze niż kwas askorbinowy (AA), glutation (GSH) i L-cysteina (L-C) (Ryc. 3A). AA i UA nie wykazują wysokiej reaktywności względem nadtlenu wodoru (Ryc. 3B). Wyższą reaktywnością względem H_2O_2 cechują się GSH i L-C, których wartość TE uległa obniżeniu względem danych kontrolnych. W środowisku zawierającym H_2O_2 obliczona wartość równoważników troloksu (TE od ang. trolox equivalents) EGT jest porównywalna z wartościami TE dla GSH i L-C. Uwarunkowane jest to wyższą reaktywnością związków tiolowych względem H_2O_2 w porównaniu do EGT, która w pH buforu reakcyjnego występuje w strukturze tiomocznikowej.

EGT wykazuje niewielką reaktywność względem AAPH (Ryc. 3C). Pozostałe związki utleniające również nie wykazują wysokiej reaktywności względem AAPH; w środowisku z AAPH, stosunkowo najmniejsze obniżenie TE względem próby bez oksydanta wykazała EGT. W przypadku zastosowania wodoronadtlenku tert-butylu (TBOOH) reaktywność badanych związków była zbliżona do reakcji z AAPH, w sposób analogiczny stwierdzono również istotności statystyczne (Ryc. 3D). Spośród wszystkich badanych substancji największą reaktywność względem TBOOH wykazuje L-C. Obecność dichromianu potasu w układzie reakcyjnym powoduje obniżenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej AA z uwagi na charakterystyczną reakcję redukcji Cr(VI) do Cr(III) inicjowaną przez AA (Ryc. 3E) [103]. Najniższą reaktywność względem dichromianu potasu wykazuje natomiast UA. Zaledwie 10% pierwotnego stężenia antyoksydantów tiolowych przereagowuje z dichromianem potasu. Uzyskane dane wskazują na dobre właściwości przeciwutleniające EGT, porównywalne z antyoksydantem modelowym troloksiem. EGT w przeciwieństwie do antyoksydantów tiolowych nie ulega samoutlenieniu oraz wykazuje niską reaktywność względem nadtlenu wodoru (Ryc. 3A-B).

Drugim testem zastosowanym w celu oceny całkowitej zdolności antyoksydacyjnej EGT był test FRAP. Zasada działania testu FRAP opiera się o reakcję redukcji jonu żelazowego

Fe^{3+} do jonu żelazowego Fe^{2+} przez badaną substancję. Z uwagi na zasadę działania tej metody, nie jest ona stosowana do oceny przeciwutleniaczy, których mechanizm działania opiera się o zmiatanie rodników na drodze transferu wodoru – w szczególności tioli jak GSH czy L-C [104]. Test FRAP przeprowadza się w środowisku o niskim pH. Mając świadomość tych ograniczeń wybrano ten test, aby sprawdzić, czy całkowita zdolność antyoksydacyjna EGT ulegnie zmianie w takich warunkach. EGT, która ma strukturę tiomocznikową, w fizjologicznym pH jest stosunkowo słabo reaktywna w porównaniu do antyoksydantów tiolowych. Zgodnie z wykładnią literatury przedmiotu, GSH i L-C w teście FRAP powinny wykazywać bardzo niską reaktywność z jonami żelaza. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają niską reaktywność związków tiolowych w teście FRAP (Ryc. 4). Wyniki doświadczenia metodą FRAP sugerują, że w środowisku o niskim pH EGT najprawdopodobniej zachowuje strukturę tiomocznikową i reaktywność względem jonów żelaza na poziomie troloksu (Ryc. 4A). Najwyższą całkowitą zdolność antyoksydacyjną wśród badanych związków w teście FRAP wykazują AA i UA.

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że EGT reaguje w teście FRAP z H_2O_2 (następuje spadek wartości TE EGT o około 40% względem próby bez utleniacza) (Ryc. 4B). Pomimo tego, że AA oraz UA wykazują większą reaktywność względem H_2O_2 , to nadal osiągają wyższe wartości TE w teście FRAP niż EGT. EGT wykazuje porównywalną reaktywność względem AAPH jak w przypadku reakcji z H_2O_2 (Ryc. 4C). Podobną reaktywność zaobserwowano w przypadku AA i UA. W obecności TBOOH, EGT wykazuje wartości TE na poziomie około $1 \mu\text{mol TE}/\text{cm}^3$. Wyniki uzyskane dla AA i UA nie różniły się znacząco w obecności TBOOH w porównaniu do pomiarów z poprzednimi utleniaczami (Ryc. 4D). Największą zmianę zaobserwowano dla AA po reakcji z dichromianem potasu – nastąpił spadek wartości TE do poziomu około $0,15 \mu\text{mol TE}/\text{cm}^3$ (Ryc. 4E). W przypadku EGT i UA wartości TE wynoszą kolejno $1 \mu\text{mol TE}/\text{cm}^3$ i $1,7 \mu\text{mol TE}/\text{cm}^3$.

Zgodnie z przewidywaniami antyoksydanty tiolowe nie redukowały jonu żelazowego, wykazując najniższą reaktywność ze wszystkich testowanych substancji w teście FRAP (Ryc. 4). Wydajność antyoksydacyjna EGT w teście FRAP była niższa niż AA i UA. We wszystkich przypadkach EGT wydajniej reagowała z jonami żelaza, osiągając wyższe wartości TE. Uzyskane dane sugerują, że niskie pH nie wpływa, bądź wpływa nieznacznie, na całkowitą zdolność antyoksydacyjną EGT. W porównaniu do występujących endogennie związków tiolowych, EGT nie zmiata RFT poprzez transfer wodoru, dzięki czemu – w odróżnieniu od GSH i L-C – redukuje jon żelaza w teście FRAP. Nie ulega również reakcji

z jonami chromu. Z tego wynika, że EGT jako związek o działaniu antyoksydacyjnym jest stabilna w warunkach niskiego pH.

Wyniki testów *in vitro* są zbieżne z wynikami dostępnymi w literaturze przedmiotu [39,105–107]. EGT to związek o dobrych właściwościach antyoksydacyjnych [70]. W odróżnieniu od większości małowcząsteczkowych antyoksydantów egzogennych, EGT ulega regeneracji katalizowanej przez GSH, dzięki czemu tylko w niewielkim stopniu jest wydalana z organizmu. Regeneracja utlenionej w wyniku reakcji z tlenem singletowym $^1\text{O}_2$ cząsteczki EGT odbywa się na drodze nieenzymatycznego i wieloetapowego cyklu wymagającego czterech cząsteczek GSH [2]. W cyklu regeneracji generowane są cząsteczki GSSG. Badacze sugerują, że z uwagi na cykl regeneracji, EGT należy postrzegać jako związek ściśle związany z parą redoks GSH/GSSG. Tylko w obecności pary GSH/GSSG EGT wykazuje pełną zdolność antyoksydacyjną w układach biologicznych.

Aby lepiej wyjaśnić rolę EGT w układach komórkowych zdecydowałem o wykorzystaniu generatora tlenku azotu DETA NONOate (DETA), którego okres półtrwania w roztworach wodnych wynosi 20 godzin, oraz wodorosiarczyny sodu menadionu (MD), będącego generatorem anionorodnika ponadtlenkowego. Pierwotnie doświadczenia z reaktywnymi formami azotu (RFA) postanowiono przeprowadzać z wykorzystaniem syntetyzowanego na świeżo nadtlenuazotynu ONOO^- . Przeprowadzono zarówno testy *in vitro* jak i doświadczenia na linii komórkowej SH-SY5Y. Jednakże z uwagi na szybką i niekontrolowaną dekompozycję tego związku podjęto decyzję o zmianie go na generator tlenku azotu NO, którego czas półtrwania i ilość generowanej RFA jest stały. Dane literaturowe wskazują, że DETA NONOate w stężeniu 1 mmol/dm^3 w 37°C utrzymuje w środowisku stężenie NO na poziomie $\leq 1 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ przez 24 godziny od momentu inicjacji reakcji [108]. Natomiast decydującym kryterium doboru MD była zdolność do uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego, który w układach biologicznych stanowi jedną z najważniejszych RFT.

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) uznał EGT jako substancję bezpieczną, niewykazującą działania toksycznego względem zwierząt [29,30]. Aby ustalić odpowiednie stężenia badane dla linii SH-SY5Y skorzystano z danych dotyczących stężenia EGT u ludzi i zwierząt, na przykład: ludzka surowica zawiera średnio $56 \pm 47 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ EGT [109], we krwi pełnej pobranej od zdrowej osoby stężenie EGT wynosi około $166 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ podczas gdy krew osób chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna zawiera średnio $43,6 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ EGT [110]. Stężenie EGT we krwi ludzi zmienia się z wiekiem [3], jest zależne od diety, aktywności ruchowej, chorób itd. [70].

Z przeprowadzonych w 2018 roku badań wynika, że maksymalny poziom akumulacji EGT w wątrobie myszy po 28 dniach diety zawierającej 70 mg/kg/dzień EGT wynosi 202,6 ng/mg [74]. Natomiast we krwi pełnej badanych zwierząt najwyższe odnotowane stężenie EGT wynosiło 192,36 ng/ μ l, co w przeliczeniu na stężenie molowe daje wartość 838,9 μ mol/dm³. Bazowe zmierzone stężenia EGT w tkankach myszy wynosiły kolejno: w wątrobie 80,65 ng/mg, we krwi pełnej 58,99 ng/ μ l, zaś w mózgu 3,73 ng/mg (po 28 dniach suplementacji wzrosło do 10,66 ng/mg). Po 28 dniach kontrolowanej diety z dużą zawartością EGT w żadnym z mysich narządów nie odnotowuje się stężenia EGT przekraczającego 1 mmol/dm³.

W badaniach pilotażowych do niniejszej rozprawy zbadano cytotoksyczność EGT i wybrano stężenia niepowodujące cytotoksyczności ostrej. Analogicznie zbadano wpływ związków o działaniu utleniającym na komórki linii SH-SY5Y, aby dobrać odpowiednie stężenia. Analiza danych literaturowych sugeruje, że toksyczność EGT różni się w zależności od modelu badawczego. Przykładowo, komórki linii HeLa inkubowane z 1 mmol/dm³ EGT nie wykazują spadku przeżywalności i cechują się wyższą odpornością na cytotoksyczne działanie H₂O₂ (1 mmol/dm³) [68]. 1 mmol/dm³ EGT znosi cytotoksyczne działanie pirogalolu (100 μ mol/dm³) z 77% do 22% w ludzkich komórkach śródbłonki mikronaczyniowego mózgu (HBMECs) [111]. Autorzy zapewniają, że komórki HBMECs nie wykazują spadku przeżywalności po inkubacji z EGT w stężeniu nawet 10 mmol/dm³, choć nie dostarczają na ten temat żadnych dowodów, co może budzić wątpliwości.

Komórki hybrydowej linii N-18-RE-105 nie wykazują spadku przeżywalności po inkubacji z EGT w stężeniu do 5 mmol/dm³ [106]. Stężenie 5 mmol/dm³ jest nieosiągalne w komórkach nerwowych *in vivo*, gdyż jest limitowane barierą krew-mózg. Preinkubacja z EGT w zakresie stężeń do 5 mmol/dm³ zmniejsza efekt cytotoksyczny indukowany przez N-acetylo-cysteinę (5 mmol/dm³) i H₂O₂ (1 mmol/dm³) na komórki linii N-18-RE-105 [106]. EGT (500 μ mol/dm³) hamuje proliferację szczyrzych progenitorowych komórek nerwowych obniżając objętość neurosferoidów w porównaniu do hodowli kontrolnej [112]. Proliferacja progenitorowych komórek nerwowych jest stymulowana przez RFT [113]. EGT promuje różnicowanie się komórek nerwowych – efekt ten nie występuje w komórkach z wyciszoną ekspresją genu *slc22a4*. Przyczyną tego działania może być indukcja ekspresji czynnika transkrypcyjnego Math1 (Atoh1) będącego markerem różnicowania się komórek nerwowych [112]

Literatura przedmiotu dostarcza przykładowych danych dotyczących antyoksydacyjnego działania EGT w układach biologicznych, np. suplementacja EGT komórek linii HeLa

chroni przed stresem oksydacyjnym wywoływany przez pirogalol [68]. EGT w komórkach HBMECs zmiata anionorodnik ponadtlenny generowany przez układ hipoksantyna/oksydaza ksantynowa, zapobiegając śmierci komórek [111]. Preinkubacja komórek z EGT zapobiega powstawaniu uszkodzeń DNA indukowanym przez nadtlenoazotyn ONOO^- (1 mmol/dm^3) [106].

Uzyskane przez mnie dane sugerują, że suplementacja komórek SH-SY5Y EGT w stężeniu 50 i $75 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ chroni komórki przed cytotoksycznym wpływem H_2O_2 , AAPH oraz DETA (Ryc. 6). Preinkubacja komórek z EGT w stężeniu $75 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ uwrażliwia je na cytotoksyczne działanie MD. Sugeruje to możliwość powstawania toksycznej pochodnej MD w reakcji z EGT bądź produktem utleniania EGT, który powoduje większe uszkodzenia struktur komórkowych niż MD, ponieważ wykazano, że EGT reaguje z anionorodnikiem ponadtlennym [111], w związku z czym najprawdopodobniej zachodzić musi bezpośrednia reakcja pomiędzy MD a EGT.

EGT jest pochodną histydyny (His). W obecności nadtlenu wodoru His indukuje efekt genotoksyczny katalizowany przez formujące się kompleksy His-żelazo-DNA [114]. Prowadzi to do powstania podwójnych pęknięć helisy DNA. W odróżnieniu od His, EGT chroni komórki przed działaniem H_2O_2 (Ryc. 6). Interesujących wyników dostarczają badania przeprowadzone przez Liao i wsp. [115], w których wykazano, że EGT jest niekompetycyjnym inhibitorem tyrozynazy o działaniu około sześciokrotnie silniejszym niż jej zdolność do zmiatania 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH), czego nie wykazuje His. Funkcja EGT w organizmie człowieka może być znacznie bardziej złożona niż u producentów EGT i zależeć od typu komórek i tkanek, w których EGT jest akumulowana.

EGT charakteryzuje się dobrą całkowitą wydajnością antyoksydacyjną w kontrolowanych warunkach bezkomórkowych (Ryc. 3-4). Jednakże wydzielane zewnątrzkomórkowo i obecne w pożywce związki mogą wpływać na antyoksydacyjne właściwości EGT. Komórki SH-SY5Y inkubowane przez 24 godziny z EGT w stężeniu $50 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ nie wykazują generacji RFT i RFA względem komórek kontrolnych (Ryc. 7). Uzyskane wyniki korelują z dotychczas opublikowanymi danymi literaturowymi [3]. EGT chroni przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez H_2O_2 (Ryc. 8). Gdy stresorem jest DETA, EGT wzmacnia generację RFT/RFA (Ryc. 8). EGT powoduje istotne obniżenie poziomu $\text{O}_2^{\bullet-}$ w komórkach traktowanych MD, a także wzmocnienie generacji H_2O_2 indukowanej przez AAPH lub DETA (Ryc. 11B-C). Traktowanie komórek H_2O_2 czy MD spowodowało podwyższenie poziomu H_2O_2 wewnątrz komórek. Preinkubacja z EGT nie zapobiegła indukcji stresu oksydacyjnego przez te związki. Pomiary poziomu tlenu azotu

sondą DAF-FM, wykazały generację NO tylko w przypadku traktowania komórek DETA. Preinkubacja z EGT nie spowodowała zmian w generacji RFA w badanym układzie komórkowym. Pomiar sondą fluorescencyjną H₂DCFDA wykazały nasilenie generacji RFT w komórkach, które były preinkubowane z EGT i traktowane DETA. Podobne zjawisko zaobserwowano podczas pomiarów sondą fluorescencyjną DHR123, która wykazała zwiększoną generację RFT, gdy komórki preinkubowano z EGT i traktowano AAPH.

Z danych przedstawionych przez Takahashi i wsp. [116] wynika, że przedłużający się stan nadprodukcji NO prowadzi do zwiększenia agregacji białek tau w komórkach linii SH-SY5Y. DETA w zakresie stężeń 1 – 2 mmol/dm³ prowadzi do zwiększenia poziomu S-nitrozylowanych białek, inaktywacji proteasomu i zaburzenia oddychania komórkowego. Stężenie DETA stosowane w doświadczeniach do niniejszej rozprawy wynosiło 250 μmol/dm³ dla komórek linii SH-SY5Y, czyli poniżej granicy, od której Takahashi i wsp. [116] odnotowali wzrost poziomu S-nitrozylowanych białek. Ocena generacji NO wykazała wzrost poziomu NO po inkubacji z DETA względem komórek kontrolnych (Ryc. 12C), a preinkubacja z EGT nie wykazała modulacji poziomu NO. Odnotowano wzrost poziomu H₂O₂ po inkubacji z DETA, wzmacniany przez EGT (Ryc. 11C). EGT wzmacnia indukowaną przez DETA generację RFT/RFA (Ryc. 8C). DETA wykazuje zdolność do zależnego od stężenia modulowania potencjału czynnościowego w szczurzych neuronach, ponadto bezpośrednio i niezależnie od wydzielanego NO, aktywuje kanały kationoselektywne w błonie komórkowej, powodując zwiększenie dokomórkowego prądu kationów [117]. Wydzielany przez DETA tlenek azotu może przyczyniać się do produkcji H₂O₂ [118] i O₂^{•-} oraz w niewielkim stopniu ONOO⁻ [119]. NO powoduje inhibicję katalazy poprzez przyłączanie się do hemu, skutkując zwiększeniem poziomu H₂O₂ w komórkach [120]. Krótkotrwała (6-godzinna) inkubacja komórek z DETA prowadzi do aktywacji kaspaz zależnych od białka p38, natomiast 24-godzinna inkubacja z DETA powoduje inaktywację kaspaz i zwiększa udział komórek nekrotycznych w próbie [120]. Autorzy postulują, że w NO-zależnej indukcji apoptozy pośredniczy H₂O₂, natomiast indukcja nekrozy zależna jest od deplecji ATP i endogennych tioli [120].

Z zaprezentowanych przeze mnie danych nie wynika, że EGT stymuluje produkcję NO w komórkach linii SH-SY5Y. Jednakże, komórki preinkubowane z EGT, wykazują wyższy poziom H₂O₂ niż komórki, których nie preinkubowano z EGT. H₂O₂ jest w tym układzie produktem reakcji EGT z O₂^{•-} [78]. EGT w fizjologicznym stężeniu (1 – 200 μmol/dm³)

powoduje zależne od NO rozluźnienie szczurzej aorty i przedłuża okres półtrwania NO, poprzez zmiatanie $O_2^{\cdot-}$ [121]. Wynika z tego, że stała szybkości reakcji EGT z $O_2^{\cdot-}$ jest wyższa od stałej szybkości reakcji NO z $O_2^{\cdot-}$. EGT nie wykazuje działania cytotoksycznego względem komórek śródbłonna aorty nawet w stężeniu 1 mol/dm^3 [122].

EGT zadziałała ochronnie względem komórek linii SH-SY5Y traktowanych H_2O_2 , AAPH i DETA, przywracając przeżywalność hodowli do wartości kontrolnych. 24-godzinna inkubacja komórek z EGT w stężeniu $75 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ nie powoduje indukcji procesu apoptozy w komórkach linii SH-SY5Y (Ryc. 13). Preinkubacja z EGT spowodowała zmniejszenie ilości komórek będących: w stadium nekrozy po traktowaniu hodowli H_2O_2 , we wczesnym etapie apoptozy po traktowaniu AAPH, w stadium nekrozy i na późnym etapie apoptozy po traktowaniu DETA, a także we wszystkich etapach apoptozy po traktowaniu MD. Przedstawione wyniki sugerują, że suplementacja komórek SH-SY5Y z EGT może przeciwdziałać indukcji apoptozy aktywowanej przez związki o działaniu utleniającym. Preinkubacja z EGT prowadzi do represji apoptozy indukowanej przez H_2O_2 i AAPH i spowalnia przebieg apoptozy indukowanej przez DETA i MD. Sugeruje to możliwość wykorzystania EGT jako czynnika przeciwdziałającego apoptozie zależnej od stresu oksydacyjnego. EGT jest wydajnym związkiem przeciwdziałającym apoptozie wywoływanej również przez np. cisplatynę [123] czy jony żelaza [124]. Badania przeprowadzone na komórkach linii PC12 dowodzą, że preinkubacja komórek z EGT obniża cytotoksyczne i genotoksyczne działanie H_2O_2 , oraz powoduje inhibicję szlaku p38-MAPK i Akt [125].

Transporter SLC22A4 występuje powszechnie w organizmie ludzkim i zapewnia import EGT do wnętrza komórek. W doświadczeniach oceniających zdolność EGT do modulacji ekspresji genu *slc22a4* wykazano, że EGT stosowana w stężeniach do $125 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ nie powoduje nadekspresji *slc22a4* (Ryc. 14). Zastosowanie EGT w stężeniu $200 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ wywołało zwiększoną ekspresję genu *slc22a4* względem komórek kontrolnych. Indukcja ekspresji dopiero przy tak wysokim stężeniu może sugerować, że obecny konstytutywnie w komórkach linii SH-SY5Y poziom transportera dla EGT, jest wystarczający do prawidłowego funkcjonowania komórek tej linii.

Pomiar poziomu ATP w komórkach linii SH-SY5Y wykazał obniżenie poziomu ATP po 24-godzinnej inkubacji komórek z EGT w stężeniu $200 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$. Zmiana w poziomie ATP może być efektem modulacji procesu apoptozy (Ryc. 18). Wykonano także dalsze doświadczenia, które wykazały brak zmian w potencjale mitochondrialnym komórek traktowanych EGT [nie pokazano].

Nieustannie poszukuje się nowych sposobów leczenia chorób neurodegeneracyjnych, a w szczególności chorób Parkinsona i Alzheimerera. EGT posiada właściwości, które umożliwiają zakwalifikowanie jej do grupy nutraceutyków o potencjale neuroprotektynym. Jest ona związkiem nietoksycznym, stabilnym i dobrze rozpuszczalnym w roztworach wodnych. W organizmie ludzkim wykrywa się ją w miejscach szczególnie narażonych na stres oksydacyjny oraz stwierdza się jej zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg. Wykorzystanie tego związku we wsparciu terapii chorób neurodegeneracyjnych mogłoby przynieść korzyści pacjentom i wesprzeć terapię konwencjonalną.

Procesy neurodegeneracyjne, w szczególności związane z agregacją białek, bardzo często prowadzą do indukcji procesu apoptozy. Działanie przeciwdziałające procesom neurodegeneracyjnym indukowane przez EGT dowiedziono także na transgenicznym modelu *Caenorhabditis elegans* CL2006 *dvls2*, cechującym się nadekspresją prekursora ludzkiego β -amyloidu ($A\beta$) [79]. Zastosowanie EGT w stężeniach 2 i 5 mmol/dm³ przedłużało życie nicieni o kolejno 6% i 11% względem osobników kontrolnych. EGT w powyższych stężeniach w znacznym stopniu zapobiegało również karbonylacji białek indukowanej przez parakwat (10 mmol/dm³). Wykazano również działanie zapobiegające oligomeryzacji $A\beta$ indukowane przez EGT (5 mmol/dm³). Suplementacja EGT (0,5 mg/kg masy ciała) zmniejszała neurotoksyczne działanie D-galaktozy u szczurów, wpływając na procesy zapamiętywania oraz uczenia się [126]. Stosowana jednocześnie z melatoniną (10 mg/kg masy ciała; MEL) wykazywała działanie utrzymujące parametry biochemiczne oznaczane w modelu zwierzęcym na poziomie niewiele odbiegającym od fizjologicznego. Na poziomie molekularnym EGT i MEL powodują zmniejszenie akumulacji β -amyloidu i utrzymują stężenie acetylocholinoesterazy na poziomie równym grupie kontrolnej.

Poza substancjami aktywnymi poszukuje się także nowych celów terapeutycznych w celu leczenia chorób neurodegeneracyjnych. Jednym z badanych celów terapeutycznych jest kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK3). GSK3 jest kinazą serynowo-treoninową biorącą udział w wielu procesach komórkowych takich jak proliferacja, różnicowanie czy adhezja komórek [127]. Występuje w postaci paralogów α i β . Aktywność GSK3 regulowana jest poprzez fosforylację katalizowaną głównie przez kinazy Akt, kinazę białkową A, kinazę białkową C czy kinazę p70 S6 [128]. Fosforylacja GSK3 w pozycji Ser-21 lub Ser-9 powoduje, że N-końcowy ogon struktury GSK3 lokalizuje się w domenie wiążącej substrat, blokując tym samym miejsce aktywne GSK3 [128] i hamuje jego kanoniczną aktywność enzymatyczną.

W komórkach SH-SY5Y kinaza GSK3 występuje głównie w cytozolu; relokalizacja do jądra następuje w efekcie stresu prowadzącego do apoptozy, wywołanego np. szokiem

cieplnym, deprywacją surowiczą lub traktowaniem komórek staurosporyną [129]. Istotna jest sygnalizacja GSK3 z udziałem dopaminy. Dopamina łącząc się z receptorem dopaminowym D2 aktywuje znajdującą się na β -arestynie fosfatazę białkową 2A, która inaktywuje kinazę Akt prowadząc do zwiększonej aktywacji GSK3 [130,131]. Wysoka aktywność GSK3 indukuje produkcję β -amyloidu [132] i fosforylację białek tau, prowadząc do ich stabilizacji (jest to proces nieodwracalny) [133].

Ponadto GSK3 aktywuje apoptozę w komórkach nerwowych, która może prowadzić do utraty neuronów w chorobie Alzheimera [134]. Stwierdzono, że zastosowanie inhibitorów GSK3 poprawia funkcje poznawcze u myszy będących modelem choroby Alzheimera [135].

Jednym z poznanych inhibitorów GSK3 jest lit, stosowany klinicznie w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej. Molekularne działanie litu polega na wyparciu jonu magnezu Mg^{2+} z cząsteczki GSK3 i kompetycyjne przyłączenie się do niej lub pośrednio, poprzez zwiększenie częstości fosforylacji GSK3 w pozycji Ser9 [128].

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerują, że cytotoksyczność litu w komórkach SH-SY5Y jest zależna od czasu inkubacji oraz stężenia LiCl (Tab. 3). Nie wykazano różnic w przeżywalności komórek preinkubowanych z EGT. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerują, że EGT nie wpływa na przeżywalność komórek linii SH-SY5Y traktowanych LiCl, niezależnie od czasu inkubacji. Z uwagi na antyoksydacyjne właściwości EGT postanowiono wykonać eksperymenty oceniające potencjał litu do generacji RFT/RFA w komórkach SH-SY5Y. Przedstawione dane wskazują, że 6 mmol/dm³ LiCl w komórkach SH-SY5Y nie powoduje generacji RFT (Ryc. 16). Niemniej jednak, EGT w stężeniach 200 i 400 μ mol/dm³ spowodowała indukcję generacji RFT zmierzoną sondą DCFDA (Ryc. 16). Doświadczenie rozszerzono o pomiar sondami DHE, MitoSOX, DHR123 i DAF-FM, z których tylko pomiar sondą DHR123 wykazał modulację wewnątrzkomórkowego poziomu RFT po 24-godzinnej inkubacji z EGT (Ryc. 17). Sonda DHR123 reaguje z H₂O₂ oraz w niskim pH z ONOO⁻. Specyfika warunków panujących w komórce eukariotycznej nie sprzyja reakcji DHR123 z ONOO⁻, co sugeruje, że zmierzoną RFT jest najpewniej H₂O₂. Traktowanie komórek LiCl nie wpływa na generację H₂O₂, niezależnie od preinkubacji z EGT. EGT w stężeniu 50 μ mol/dm³ nie powodowała generacji H₂O₂ (Ryc. 11). Natomiast 24-godzinna inkubacja z EGT w stężeniu 200 μ mol/dm³ spowodowała 10-krotny wzrost intensywności fluorescencji sondy DHR123 (Ryc. 17). Biorąc pod uwagę doniesienia o reaktywności EGT z anionorodnikiem ponadtlenkowym, obserwowany wzrost fluorescencji DHR123 może być związany z generacją nadtlenu wodoru w wyniku reakcji dysmutacji anionorodnika

ponadtlenkowego [78,121], bądź też na drodze reakcji chelatacji jonów metali przejściowych ograniczających dostępność jonów metali, z którymi nadtlenek wodoru mógłby przereagować [9,16].

Indukcja apoptozy, choć często ściśle powiązana ze stresem oksydacyjnym, nie jest od niego w pełni zależna. W celu oceny potencjału litu do aktywacji apoptozy wykonano doświadczenie analogiczne do poprzednio wykonywanego dla komórek traktowanych oksydantami. W badanym układzie doświadczalnym LiCl w stężeniu 6 mmol/dm³ po 24 godzinach inkubacji powodował indukcję apoptozy w komórkach linii SH-SY5Y (Ryc. 18). Nie wykazano zdolności do indukcji apoptozy przez LiCl w stężeniu 1 mmol/dm³. Niewielką zmianę zauważyć można również w próbach preinkubowanych z EGT w stężeniu 200 μmol/dm³. Wynik koreluje z przedstawionymi wynikami indukcji generacji RFT/RFA przez EGT w stężeniu 200 μmol/dm³. Natomiast zastosowanie preinkubacji z EGT a następnie traktowanie komórek LiCl, znosi toksyczność LiCl. Wydajność działania ochronnego indukowanego przez EGT jest zależna od stężenia LiCl. Dane literaturowe sugerują, że apoptoza indukowana przez LiCl jest zależna od sygnalizacji na osi Wnt/β-katenina i aktywacji kaspazy-3 i kaspazy-9 [136,137].

Autofagia w komórkach nerwowych pełni ważną rolę podczas rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Aktywność tego procesu ulega deterioracji w starzejących się komórkach nerwowych, skutkując niewydolnym systemem degradacji nieprawidłowych organelli i białek [138]. Sprawdzone potencjał EGT do modulacji aktywności autofagii. Preinkubacja z EGT w stężeniu 200 μmol/dm³ prowadzi do zmniejszenia ilości wakuol autofagowych w komórkach linii SH-SY5Y względem komórek kontrolnych (Ryc. 19). W celu identyfikacji białek biorących udział w represji autofagii przez EGT należało przeanalizować modulację oddolnych regulatorów procesu autofagii. GSK3 reguluje aktywność wielu substratów, w tym m.in. odpowiedzialnych za modulację procesu autofagii, na przykład, od aktywności GSK3β zależy indukcja procesu autofagii poprzez fosforylację czynnika ULK1 [139].

W aspekcie chorób neurodegeneracyjnych inhibicja szlaku GSK3 jest procesem korzystnym, ponieważ nadmierna aktywność GSK3β prowadzi do fosforylacji białka prekursorowego amyloidu oraz białek tau [140]. Laboratoryjne modele zwierzęce parkinsonizmu przygotowuje się najczęściej stosując 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydynę (MPTP) lub 6-hydroksydopaminę (6-OHDA), które powodują indukcję kaspazy-3. Dane z modeli komórkowych pokazują, że LiCl hamuje indukcję kaspazy-3, zapobiegając śmierci komórek SH-SY5Y [141] oraz moduluje szereg innych procesów

komórkowych takich jak stres oksydacyjny, aktywność neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego czy szlaku kalpaina-Cdk5 [142]. Połączenie suplementacji EGT z LiCl mogłoby wzmacniać efekt neuroprotekcyny obu tych związków.

Celem kolejnych doświadczeń było wykazanie czy EGT suplementowana komórkom linii SH-SY5Y wpłynie na inhibicję GSK3 indukowaną przez LiCl. Komórki traktowane LiCl w stężeniu 6 mmol/dm³ wykazały indukcję poziomu p-GSK3β (Ser9) po 60 minutach inkubacji z litem (Ryc. 20). Wzrost poziomu p-GSK3β (Ser9) trwał przez 120 minut od momentu rozpoczęcia inkubacji, po czym poziom p-GSK3β (Ser9) zaczął spadać. Zastosowanie preinkubacji z EGT obniżyło maksymalny poziom białka p-GSK3β (Ser9) względem próby kontrolnej. Zaobserwowana różnica może mieć związek z aktywnością fosfataz. Fosfataza białkowa 2A jest jednym z enzymów odpowiedzialnych za defosforylację p-GSK3β (Ser9) i została powiązana z mechanizmem toksyczności 6-hydroksydopaminy na drodze defosforylacji p-GSK3β (Ser9) [141]. Wpływ EGT na poziom p-GSK3β (Ser9) i modulacja przez EGT poziomu autofagii sugeruje możliwość istnienia związku pomiędzy poziomem fosforylowanego białka GSK3 a sygnalizacją zależną od ULK1. Oceniono wpływ EGT na fosforylację inhibicyjną p-ULK1 (Ser757) zależną od aktywności GSK3. Dla próby preinkubowanej z EGT wykazano obniżony względem próby kontrolnej maksymalny poziom białka fosforylowanego oraz spowolnienie procesu defosforylacji. Uzyskane dane sugerują istnienie zależności pomiędzy EGT a białkami GSK3 i ULK1, z uwagi na modulację aktywności autofagii przez EGT jak i modulację fosforylacji obu tych białek. Jednakże potrzeba większej ilości danych by móc należycie opisać zachodzące w komórkach zmiany.

Iqbal i wsp. [143] opublikowali pracę, w której wykazali EGT działanie hamujące przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT) indukowane lipopolisacharydem (LPS) na modelu zwierzęcym. Traktowanie zwierząt LPS-em prowadziło do powstania ostrego urazu płuc objawiającego się uszkodzeniem tkanki płucnej, obniżeniem poziomu endogennych enzymów antyoksydacyjnych, interleukiny 1β i TNF-α, podwyższeniem poziomu Smad2/3, Smad4, NF-κB, Snail, wimentyny oraz znacznym obniżeniem poziomu E-kadheryny. Takie zmiany w komórce sugerują możliwość indukcji przejścia EMT. Suplementacja EGT prowadziła do inhibicji obserwowanych zmian poprzez obniżenie poziomu białek TGF-β, Smad2/3, Smad4, Snail, wimentyny, NF-κB i cytokin prozapalnych oraz przywrócenie poziomu e-kadheryny i enzymów antyoksydacyjnych w zależności od stężenia EGT. Autorzy konkludują, że EGT w dawce 100 mg/kg jest równie efektywna co lek referencyjny (febuksostat). Preinkubowane z EGT komórki śródbłonna wykazują zależną od stężenia

EGT redukcję poziomu pierwszej cząsteczki adhezyjnej śródbłonka (VCAM-1), szczególnie w układzie pobudzającym ekspresję tego białka (komórki stymulowane IL-1 β) [122].

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały wpływ EGT na poziom fosforylacji inhibicyjnej białek GSK3 i ULK1.

Represja E-kadheryny jest sygnałem rozpoczynającym przejście EMT. Za represję E-kadheryny odpowiada czynnik transkrypcyjny ZEB1. W celu oceny potencjału EGT do modulacji przejścia EMT w komórkach SH-SY5Y przeprowadzono pomiar poziomu białek markerowych. Spośród wybranego panelu białek markerowych tylko ZO1 i ZEB1 uległy modulacji pod wpływem traktowania komórek EGT (Ryc. 22). Białko ZO1 odpowiedzialne jest za wytwarzanie połączeń ścisłych (zamykających) z sąsiadującymi komórkami. Jest to białko typowe dla fenotypu epitelialnego, którego synteza ulega represji w wyniku aktywacji przejścia EMT. Zgodnie z kanonicznym szlakiem EMT represja białka ZO1 powiązana jest z utratą połączeń międzykomórkowych i prowadzi do uzyskania przez komórkę fenotypu mezenchymalnego. Koh i wsp. [144] przedstawili, że godzinna inkubacja z EGT w stężeniu 1 mmol/dm³ nie prowadzi do zwiększenia poziomu mRNA kodującego białka ZO-1, kładynę-5 i okładynę. Wykazano natomiast, że EGT zapobiega indukowanej przez 7-ketocholesterol relokalizacji białek ZO1 i kładyny-5 w pobliże jądra komórkowego.

Z kolei ZEB1 to czynnik transkrypcyjny odpowiadający przede wszystkim za represję genów zapewniających komórce fenotyp epitelialny, ale także indukcję genów powiązanych z mezenchymalnym fenotypem komórek. Nie zaobserwowano zmian w poziomie E-kadheryny po traktowaniu komórek EGT, pomimo tego, że po inkubacji z EGT odnotowano spadek ekspresji ZEB1. Aktywność białka ZEB1 prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu komórki, represji połączeń międzykomórkowych i modulacji faz cyklu komórkowego.

Kinaza GSK3, z uwagi na niespecyficzną substratową, reguluje aktywność wielu szlaków przekazywania sygnałów [145]. Jednym z substratów GSK3 jest β -katenina, białko rekrutowane głównie podczas kanonicznego szlaku GSK3 i szlaków EMT i Wnt. W warunkach fizjologicznych przyłączona do aksyny kinaza GSK3 fosforyluje β -kateninę, kierując ją do degradacji. Natomiast w obecności ligandu Wnt następuje fosforylacja inhibicyjna kinazy GSK3 a ustabilizowana β -katenina ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie rozpoczyna się transkrypcja genów. W komórkach SH-SY5Y EGT nie prowadzi do zmiany całkowitego poziomu β -kateniny (Ryc. 22). Jednakże obniżony poziom czynnika transkrypcyjnego ZEB1 i niższy poziom fosforylacji inhibicyjnej GSK3 β

względem próby kontrolnej sugeruje, że EGT może prowadzić do inhibicji translokacji β -kateniny do jądra komórkowego i w konsekwencji częściowej inhibicji szlaku EMT (Ryc. 22).

Uzyskane wyniki sugerują, że EGT powoduje represję przejścia EMT w komórkach SH-SY5Y, choć zmiana poziomu białka ZO1 wskazuje na proces odwrotny. Trudności w jednoznacznej ocenie modulacji przejścia EMT przez EGT powoduje sposób wzrostu hodowli komórek linii SH-SY5Y. Populacja komórek linii SH-SY5Y wykazuje heterogenność fenotypową, która ulega dynamicznym zmianom. W hodowli wyróżnić można komórki wykazujące wzrost adherentny jak i zawieszinowy. Komórki SH-SY5Y często rosną warstwowo i łączą się ze sobą, tworząc w konsekwencji sferoid o zbitej strukturze. Po osiągnięciu wystarczającej objętości sferoid traci polarność apikobazalną i odrywa się od powierzchni naczynia hodowlanego a następnie opada w innym miejscu tworząc kolonię komórek. Te dynamiczne zmiany fenotypu komórek SH-SY5Y są związane z reorganizacją ekspresji genów kodujących białka cytoszkieletu i połączeń międzykomórkowych. Na podstawie poziomu analizowanych białek wydaje się, że inkubacja z EGT powinna skutkować zmniejszonym udziałem sferoidów w populacji ogólnej komórek.

EGT wykazuje zdolność do modulacji procesu autofagii (Ryc. 19). W celu potwierdzenia tych zmian oceniono poziom białka mTOR. mTOR to kinaza serynowo-treoninowa funkcjonująca w dwóch strukturalnie i funkcjonalnie różnych kompleksach sygnalizacyjnych: mTORC1 i mTORC2 (od *mechanistic target of rapamycin complex 1/2*) [146]. Kinaza mTOR reguluje proliferację komórek oraz procesy autofagii i apoptozy [147]. Doświadczenia wykazały, że 24-godzinna inkubacja komórek SH-SY5Y z EGT spowodowała zwiększenie poziomu białka mTOR (Ryc. 23). Koreluje to z poziomem autofagii, który uległ represji pod wpływem preinkubacji z EGT.

Na aktywność kompleksu mTORC1 wpływa wiele czynników zewnętrznych, np. stężenie aminokwasów, poziom glukozy i czynników wzrostu [148]. Z uwagi na podobieństwa strukturalne do His, najbardziej prawdopodobnym mechanizmem regulacji poziomu mTOR przez EGT jest mechanizm zależny od aminokwasów. Droga aktywacji kompleksów mTORC1/2 przez aminokwasy różni się od siebie w zależności od ligandu. Transport aminokwasów do wnętrza komórek katalizowany jest przez różne białka, głównie pochodzące z rodziny SLC np. arginina transportowana jest przez transporter SLC7A1, leucyna przez transporter SLC7A5 a glutaminę transportuje białko SLC1A5 [149]. W literaturze przedmiotu brak jest informacji o przebiegu aktywacji mTOR bądź indukcji

ekspresji tego białka przez EGT. Dostępne są dane z udziałem innych aminokwasów. Przeprowadzone na ludzkich organoidach badania wykazały, że jednoczesne zastosowanie histydyny, lizyny i treoniny prowadzi do modulacji poziomu mRNA kodującego mTOR [150]. Aktywacja kompleksu mTORC1 katalizowana przez His odbywa się zależnie od szlaku GTP-azy Rag [151]. Sugeruje to, że EGT może powodować nadekspresję mTOR na drodze aktywacji szlaku zależnego od mTORC1 i GTP-azy Rag.

Główną funkcją kompleksu mTORC1 jest represja autofagii, która prowadzi do inhibicji syntezy lizosomów. Prowadzącą do tego sygnalizację rozpoczyna mTORC1 poprzez bezpośrednią fosforylację białka ULK1 odpowiedzialnego za inicjację autofagii [152], oraz czynnika transkrypcyjnego EB (TFEB) pełniącego funkcję regulującą ekspresję genów kodujących białka związane z aktywnością lizosomów (w tym również genów kodujących białka odpowiedzialne za autofagię) [153]. Powoduje to zablokowanie szlaków degradacji lizosomalnej oraz autofagii. Indukowana przez EGT modulacja poziomu ATP może być powiązana z modulacją procesów zależnych od kompleksu mTORC1 (Ryc. 15).

Odnotowany spadek poziomu białka ZO1 w komórkach SH-SY5Y wskazuje na możliwą utratę połączeń międzykomórkowych (Ryc. 22). Takie zjawisko obserwuje się u pacjentów chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna (CD; Crohn's Disease). Występujące przy CD objawy, takie jak krwawienie ze światła przewodu pokarmowego, są wynikiem utraty połączeń międzykomórkowych w tkance jelita cienkiego i/lub grubego [154]. Pacjenci chorzy na CD mają niższy poziom EGT w tkankach od reszty populacji [155]. CD została powiązana z transporterem SLC22A4 [49,65,156,157], a dokładnie z wariantem L503F transportera SLC22A4, który może przyczyniać się do mniej wydajnego transportu EGT ze światła jelita do krwiobiegu [49,157]. Działanie EGT powodujące represję białek w modelu komórkowym niekoniecznie musi mieć przełożenie na model zwierzęcy czy człowieka.

Jednym z białek odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe jest białko ZO1, którego poziom uległ obniżeniu po inkubacji z EGT. Poziom EGT u pacjentów z chorobą CD jest istotnie niższy niż u zdrowej części populacji. Sugeruje to, że EGT może mieć realny wpływ na przebieg i rozwój takich dolegliwości jak choroba CD, zapalenie jelit i inne przypadłości układu pokarmowego. Co prawda badania przeprowadzone na modelu komórkowym SH-SY5Y wskazują na represję poziomu ZO1 przez EGT, aczkolwiek nie oznacza to, że w innym układzie inkubacja z EGT spowodowałaby taki sam efekt. Stosowanie EGT u myszy chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego zmniejsza populację makrofagów i limfocytów T CD4⁺ prowadząc do wyciszenia stanu zapalnego, oraz powoduje zwiększenie poziomu okludyny w komórkach jelita [158]. Nie wyjaśnia to

jednak przyczyny podwyższenia poziomu mTOR oraz tego, w jaki sposób regulacja kinazy mTOR wiąże się z modulacją przejścia EMT.

Jedną z dróg aktywacji EMT jest niezależna od TGF- β inhibicja kompleksu mTORC1 [159]. Odbywa się to poprzez inhibicję białek mTOR bądź Raptor. Proces reorganizacji fenotypu jest regulowany przez czynniki transkrypcyjne ZEB1 i ZEB2, których poziom zauważalnie wzrasta po represji białka mTOR [159]. Hernandez i wsp. [160] informują, że inhibicja mTOR przy pomocy rapamycyny prowadzi do zwiększenia poziomu białek odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe u transgenicznymy myszy będących modelem choroby Alzheimera. W chorobach neurodegeneracyjnych poza tworzeniem się złogów białkowych i zaburzeniem gospodarki dopaminowej, wyróżnić można również znaczne osłabienie bariery krew-mózg wskutek zahamowania ekspresji genów kodujących białka wytwarzające połączenia międzykomórkowe. Inhibicja mTOR za pomocą rapamycyny indukuje biosyntezę białek ZO-1, okludyny i kładyny-5, co mogłoby przekładać się na polepszenie stanu zdrowia pacjentów [160].

Modulacja poziomu białek w komórkach SH-SY5Y jest odwrotna do przytoczonych danych literaturowych. W przypadku komórek linii SH-SY5Y traktowanie EGT prowadzi do indukcji sygnalizacji mTORC1 zależnej od aminokwasów. Literatura przedmiotu proponuje kilka modeli modulacji mTORC1 przez aminokwasy. W proces ten zaangażowane są struktury i białka takie jak V-ATPaza w błonie lizosomu, Ragulator czy GTPaza RAG [161]. Badania wykazały, że aminokwasy rozgałęzione (BCAA) są niezbędne do aktywacji mTORC1 [162]. Aktualna doktryna sygnalizacji przez aminokwasy opiera się o stymulację mTORC1 do relokalizacji w pobliże GTPazy Rheb, która aktywuje kompleks mTORC1 [161]. Aminokwasy promują aktywację białek RAG poprzez modulację zdolności heterodimeru RAG do wiązania nukleotydów guaninowych, co skutkuje rekrutacją mTORC1 do powierzchni lizosomu, gdzie natrafia na białko Rheb związane z GTP [163]. Jednakże bezpośrednie przyporządkowanie sygnalizacji zależnej od EGT do białka efektorowego wymaga przeprowadzenia większej ilości eksperymentów z uwagi na złożoność szlaku związanego z mTOR. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można zaproponować dla EGT mechanizm działania oparty o modulację poziomu białka mTOR, przekładającego się na syntezę białek ZO1 i ZEB1 w komórkach SH-SY5Y.

Celem równoległe prowadzonych doświadczeń na komórkach linii HepG2 była ocena wpływu EGT na jeden z najbardziej narażonych na stres oksydacyjny narządów w ciele człowieka - wątrobę. Przeprowadzone doświadczenia miały na celu opisać wpływ EGT na komórki tego narządu.

W celu ustalenia stężeń EGT nietoksycznych względem komórek HepG2, przeprowadzono pilotażowe badania przeżywalności komórek. Pomiar wykazały, że stężenia EGT powyżej $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ powodują efekt cytotoksyczny po 24-godzinnej inkubacji z komórkami linii HepG2. Uzyskane wyniki dotyczące przeżywalności komórek HepG2 traktowanych EGT sugerują, że mogą one być bardziej wrażliwe na działanie EGT niż komórki SH-SY5Y. Do doświadczeń na komórkach linii HepG2 wybrano stężenia 25 i $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

Dane literaturowe sugerują, że właściwości prezentowane przez EGT predysponują ten związek do przeciwdziałania skutkom glikemii. W literaturze wykazano także, że EGT ($2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) z hispidyną wzmacniają inhibicję NF- κ B w komórkach linii PC12 poddanych działaniu metylogliksalu [164]. W badanym stężeniu EGT wykazuje również zdolność do inhibicji zaawansowanych produktów glikacji (AGEs) i odpowiadającego im receptora [164]. Podawanie EGT szczurom chorym na cukrzycę typu II zapobiega uszkodzeniom wątroby, obniża stężenie glukozy we krwi oraz zapobiega wykształceniu insulinooporności u zwierząt, niezależnie od terapii metforminą [165]. EGT (16 mg/kg masy ciała) podawana przez siedem dni przed 24-godzinnym okresem głodówki utrzymuje fizjologiczny poziom mleczanów w szczurzych erytrocytach. Powoduje także obniżenie poziomu glukozy-6-fosforanu i fruktozo-6-fosforanu, co może sugerować aktywację fosfofruktokinazy przez EGT [166]. Przygotowanie komórkowego modelu hiperglikemii najczęściej polega na krótkotrwałym i gwałtownym zwiększeniu stężenia glukozy w pożywce z 5,5 do $25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$, co wiąże się z wywołaniem nagłego efektu cytotoksycznego. Zastosowanie EGT ($1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$) w pełni znosi efekt cytotoksyczny spowodowany przez indukcję hiperglikemii [111].

Zauważono także wpływ na zmiany spowodowane podwyższoną glikemią na wyższym poziomie organizacji organizmu niż komórkowy. Wysokie stężenia glukozy stosunkowo często (5-10%) prowadzą do deformacji embrionu z uwagi na działanie teratogenne [167]. Zastosowanie suplementacji EGT (1,147 mg/kg mc) przez 12 dni od zapłodnienia szczurów chorych na cukrzycę typu II obniża ilość zdeformowanych embrionów o połowę (z 31,0% do 14,7%) [167]. EGT zastosowano także w badaniach nad dojrzewaniem embrionów owiec (*Ovis aries*), gdzie $10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ EGT przyspiesza rozwój zarodków względem próby kontrolnej, a w dojrzałych oocytach wykazano niższy poziom stresu oksydacyjnego i wyższy poziom GSH [168]. Z kolei embriony bydłce są zdecydowanie bardziej wrażliwe na działanie EGT, ponieważ stężenie $1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ całkowicie hamuje rozwój embrionów wywołując efekt cytotoksyczny [169]. Dopiero poniżej stężenia $0,1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ EGT

przyczynia się do zwiększenia przeżywalności ogólnej zarodków o 15% względem próby kontrolnej. Traktowanie kurzych embrionów wysokimi dawkami kortykosteroidów wywołuje u nich zaćmę spowodowaną deplecją GSH w soczewce oka [170]. Podanie EGT ($20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) na 3 i 12-godzin po traktowaniu embrionów hydrokortyzonem spowalnia progresję zaćmy, choć nie przywraca fizjologicznego stężenia GSH w soczewce oka [170].

EGT chroni przed stresem powodowanym przez hiperglikemię poprzez nadregulację poziomu SIRT1 i SIRT6 oraz obniżenie poziomu p66Shc i NF- κ B [171]. Natomiast u kawii domowych z wyindukowaną niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby wykazano akumulację EGT w wątrobie zależną od poziomu cholesterolu w diecie – istotnie więcej EGT akumulowały zwierzęta będące na diecie wysokotłuszczowej [172]. EGT chroni również przed peroksydacją lipidów w wątrobie oraz zmniejsza zużycie endogennego GSH i α -tokoferolu na skutek traktowania szczurów octanem żelazowo-nitrylowym [173]. Zastosowanie suplementacji EGT u szczurów znosi wywołany przez żelazo stan zapalny i apoptozę na drodze redukcji poziomu czynnika martwicy nowotworów- α , interleukiny-6 i kaspazy-3 [124]. Autorzy wskazują również na modulację osi PI3K/Akt przez EGT, zahamowanie translokacji NF- κ B do jądra komórkowego oraz modulację sygnalizacji p38/c-Fos. EGT zapobiega zwłóknieniu wątroby i znosi stres oksydacyjny u myszy traktowanych dimetylonitrozoaminą [174]. Na podstawie przedstawionych doniesień literaturowych można stwierdzić, że EGT odgrywa ważną rolę w hepatocytach narażonych na działanie egzogennych stresorów.

Jak dotąd nie opublikowano wyników, które wskazywałyby na bezpośrednie toksyczne działanie EGT na wątrobę zwierząt laboratoryjnych czy modele komórkowe. Ewentualną toksyczność EGT w badaniach na zwierzętach przypisuje się działaniu n-tlenku trimetyloaminy (TMAO), który powstaje w jelitach za sprawą bytujących tam mikroorganizmów. TMAO wykazuje dodatnią korelację względem chorób takich jak nadciśnienie tętnicze, miażdżyca, udar niedokrwienny, przewlekła choroba nerek [175]. Natomiast zastosowanie EGT w hodowli komórkowej bezpośrednio wystawia komórki na działanie dodanego związku. EGT z uwagi na dobre właściwości antyoksydacyjne może w komórkach wywoływać stres redukcyjny i prowadzić do spadku przeżywalności. Jedną z przyczyn wyższej toksyczności EGT względem komórek HepG2 niż komórek SH-SY5Y może być wysoki endogenne poziom transportera SLC22A4 (Ryc. 27) w porównaniu do komórek linii SH-SY5Y (Ryc. 14). Pomimo zastosowania niższego stężenia EGT niż w doświadczeniach na komórkach SH-SY5Y, EGT wykazała silne biologiczne działanie na komórki linii HepG2. Różnice względem linii SH-SY5Y zauważono również podczas

pomiaru RFT/RFA w komórkach linii HepG2. Po 24-godzinnej inkubacji z EGT wykazano, że EGT prowadzi do istotnego obniżenia endogennego poziomu RFT (Ryc. 25A) i nadprodukcji NO (Ryc. 25C), podczas gdy w komórkach SH-SY5Y nie zaobserwowano takiej zależności (Ryc. 7).

Szczególnie interesująca wydaje się być nadprodukcja NO indukowana przez EGT, czego nie wykazano na linii SH-SY5Y. Uwolnienie bądź podwyższenie stężenia NO związane może być z modulacją wielu szlaków przekazywania sygnałów, m.in. aktywacją stanu zapalnego. Literatura przedmiotu dostarcza informacji, że na poziomie organizmowym podwyższenie poziomu NO może być związane z cytotoksycznym działaniem TMAO powstającym wskutek metabolizmu EGT. Z uwagi na modulację generacji NO, TMAO przypisuje się działanie zaburzające równowagę wazodylatacyjną naczyń krwionośnych [176]. Jednakże na poziomie komórkowym TMAO nie powstaje a EGT nie wykazuje działania cytotoksycznego względem komórek nabłonka nawet w stężeniu 1 mmol/dm³ [171], więc mechanizm odpowiadający za generację NO w układzie komórkowym nie może być zależny od generacji TMAO. W pracy Arun i Gokce (2014) wykazano, że EGT powoduje zależne od NO rozluźnienie szczykowej aorty oraz chroni NO zmiatając O₂⁻ [121]. Dane literaturowe sugerują, że powiązanie EGT z NO nie jest przypadkowe.

W celu dalszej oceny działania EGT przeprowadzono analizę poziomu metalotionein po traktowaniu komórek EGT. Redukcja fizjologicznego poziomu RFT i stymulacja wyrzutu NO może być powiązana ze zmianą poziomu endogennych przeciwutleniaczy. Metalotioneiny stanowią istotną grupę endogennych związków o działaniu antyoksydacyjnym i chelatującym metale. Przeprowadzone pomiary sugerują, że spadek ogólnego poziomu RFT (Ryc. 25A) może być powiązany ze spadkiem poziomu metalotionein (Ryc. 26). GSH uczestniczy w procesie redukcji utlenionej EGT, która jak wykazano wcześniej, prowadzi do redukcji endogennego poziomu RFT w komórkach HepG2. Metalotioneiny cechują się silnym powinowactwem do jonów cynku Zn²⁺, które odgrywają rolę w modulacji poziomu NO poprzez sekwestrację lub uwalnianie jonów Zn²⁺ z klastrów tiolanowych [177]. Dane literaturowe sugerują, że wewnątrzkomórkowa homeostaza cynku zależy od poziomu metalotionein i NO, tj. zwiększony poziom metalotionein hamuje NO-zależne zmiany konformacyjne, które są markerem uwolnienia jonów Zn²⁺ z klastrów tiolanowych [177]. Natomiast w komórkach HepG2 zaobserwowano odwrotną zależność – poziom metalotionein uległ obniżeniu a poziom NO podwyższeniu. Zgodnie z danymi literaturowymi powinno mieć to bezpośredni wpływ na stężenie

uwolnionego cynku. Możliwe, że EGT na drodze reakcji z $O_2^{\cdot-}$ zapobiega reakcji NO z $O_2^{\cdot-}$, lub z uwagi na właściwości chelatujące wiąże wolny cynk w komórce.

Wielokrotnie w literaturze przedmiotu podkreślano, że suplementacja EGT prowadzi do indukcji poziomu transportera SLC22A4 [3,53]. W przypadku komórek HepG2 zarówno na poziomie mRNA jak i białka nie wykazano istotnych statystycznie zmian poziomu transportera SLC22A4 po inkubacji z EGT (Ryc. 27). Natomiast w przeciwieństwie do komórek SH-SY5Y w lizatach białkowych z komórek HepG2 udało się wykryć transporter SLC22A4. Niemniej jednak w komórkach HepG2 traktowanych EGT nie odnotowano zmian ani na poziomie genu ani na poziomie białka dla transportera SLC22A4 względem wartości kontrolnych.

Przeprowadzone dotychczas doświadczenia potwierdziły antyoksydacyjne działanie EGT. Wykazały również, że potencjał antyoksydacyjny EGT różni się w zależności od typu komórek. W komórkach HepG2 traktowanie EGT wywołało indukcję generacji NO przy jednoczesnej redukcji całkowitego poziomu RFT. Obniżenie poziomu metalotionein sugeruje, że w komórkach mogła zajść regeneracja utlenionej EGT przy udziale GSH, stąd spadek poziomu metalotionein w komórkach. Natomiast wzrost poziomu NO może być powiązany z indukcją reakcji zapalnej w komórkach HepG2 np. na drodze aktywacji sygnalizacji zależnej od receptora TLR4. W 2022 roku opublikowano artykuł, w którym przedstawiono wyniki dotyczące wpływu EGT na szczurzy model wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (łac. *colitis ulcerosa*). EGT spowolniła proces skracania jelita grubego oraz zmniejszyła ogólną ilość uszkodzeń jelita grubego szczurów poprzez inhibicję szlaku TLR4/MyD88/NF- κ B, przyczyniając się tym samym do zmniejszenia ilości wydzielanych czynników prozapalnych [178].

W kolejnych doświadczeniach na komórkach HepG2 sprawdzono, czy EGT moduluje aktywność szlaku TLR4 oraz czy wzmacnia działanie lipopolisacharydu (LPS). Działanie LPSu opiera się o aktywację odpowiedzi immunologicznej, prowadzącej m.in. do indukcji szlaku TLR4, wyrzutu cytokin prozapalnych, generacji RFT lub RFA, aktywacji apoptozy oraz autofagii [100]. EGT spowodowała spadek poziomu RFT w komórkach z jednoczesną indukcją generacji NO, co może sugerować, że w sposób pośredni moduluje wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnałów związane z generacją NO. W celu analizy tego zagadnienia komórki linii HepG2 poddano działaniu LPS i EGT.

Pomiary przeżywalności wskazały na dobrą tolerancję LPS przez komórki linii HepG2 (Ryc. 28). W literaturze przedmiotu znaleźć można dużą różnorodność stosowanych stężeń LPS, w dużej mierze zależnych od modelu badań oraz struktury cząsteczki LPS, której

długość i zróżnicowanie łańcuchów bocznych determinują cytotoksyczność. Wybrane przeze mnie stężenie było wypadkową analizy literaturowej oraz pilotażowych testów przeżywalności. Zastosowanie stężenia 100 ng/cm³ powinno, zgodnie z wykładnią literatury, prowadzić do indukcji stanu zapalnego na drodze aktywacji receptora TLR4 w komórkach [101]. Z indukcją stanu zapalnego wiąże się wyrzut RFT/RFA, przeprowadzono więc pomiary stresu oksydacyjnego, aby określić poziom generacji RFT/RFA. Doświadczenia wykazały indukcję RFT po czterech godzinach inkubacji z LPS (Ryc. 29A) która została zniesiona przez preinkubację z EGT (Ryc. 29B). Reakcja obronna komórek wskutek aktywacji stanu zapalnego wywołanego przez LPS prowadzi do generacji RFT, co wielokrotnie prezentowano w literaturze [179]. Modulacja aktywności występującego w hepatocytach TLR4 może prowadzić np. do stłuszczenia wątroby – mechanizm oparty o sygnalizację LPS/TLR4 stanowi podstawę molekularną rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD) [180]. W komórkach HepG2, LPS indukuje wzrost poziomu H₂O₂ (Ryc. 30A), który znosi preinkubacja z EGT (Ryc. 30B). Komórki inkubowane z LPS-em wykazują zwiększoną generację NO względem próby kontrolnej (Ryc. 31A), którą wzmacniała preinkubacja z EGT (Ryc. 31B). Sugeruje to zdolność EGT do indukcji generacji NO bądź też innego działania skutkującego podwyższeniem poziomu NO.

Zmiany w równowadze redoks mogą prowadzić do przesunięcia faz cyklu komórkowego. Przeprowadzone pomiary nie wykazały zmian w rozkładzie faz cyklu komórkowego, niezależnie od preinkubacji z EGT bądź też inkubacji z LPS (Ryc. 32). Dane literaturowe dostarczają informacji o zdolności LPS do modulacji przebiegu cyklu komórkowego np. w zróżnicowanych mysich neuronach [181] czy makrofagach [182]. Z wykorzystaniem makrofagów przeprowadzono badania, które sugerują wpływ EGT na odpowiedź immunologiczną na poziomie pojedynczej komórki jak i całego organizmu. 24-godzinna preinkubacja z 10 mmol/dm³ EGT chroni ludzkie makrofagi przed wyrzutem RFT indukowanym przez LPS [99]. Immunozależny mechanizm działania EGT zauważyli także Yoshida i wsp. [183], którzy wskazali na użyteczność EGT jako substancji wspomagającej immunoterapię nowotworów. EGT (500 µg/dziennie) podawana myszom przed zastosowaniem immunoterapii złożonej z owalbuminy (OVA) i Pam2CSK4 wzmacnia działanie immunoterapii średnio dwukrotnie. Ponadto EGT prowadzi do znacznego podwyższenia stężenia IFN-γ/TNF-α w limfocytach CD8⁺ CD3⁺ pobranych z wnętrza guza nowotworowego. EGT powoduje inhibicję makrofagów związanych z guzem nowotworowym, stanowiących jedno z głównych wyzwań podczas stosowania

immunoterapii zależnej od aktywacji proliferacji cytotoksycznych limfocytów T. W grupie otrzymującej EGT odnotowano także nadekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS). Wysoki poziom iNOS jest markerem prognostycznym wskazującym na dłuższe przeżycie pacjentów onkologicznych [184]. Powyższe dane wskazują na możliwość wykorzystania EGT w terapiach przeciwnowotworowych oraz ponownie zwracają uwagę na modulację wewnątrzkomórkowego cyklu tlenu azotu.

Traktowanie hepatocytów endotoksyną jaką jest LPS prowadzi do znacznego obniżenia poziomu metalotionein względem wartości kontrolnych (Ryc. 33). Taka zależność może oznaczać, że RFT uwolnione na drodze toksycznego działania LPS-u spowodowały utlenienie znacznej ilości grup tiolowych na resztach cysteinowych endogennych metalotionein. Z kolei preinkubacja komórek z EGT wywołała efekt ochronny poprzez częściowe zahamowanie utleniania metalotionein w komórkach. Sugeruje to, że EGT obecna w komórkach zmiatała powstające RFT z którymi w przeciwnym razie zareagowałyby endogenne metalotioneiny. GSH jest niezbędne do regeneracji EGT, które ulega utlenieniu w cyklu redukcji EGT. Niższy wykryty w teście poziom metalotionein może być także związany z modulacją aktywności procesów odpowiedzialnych za degradację białek. Aby to sprawdzić przeprowadzono pomiar aktywności autofagii. W celu oceny zdolności ergotioneiny do modulacji procesu autofagii przeprowadzono doświadczenie z wykorzystaniem monodansylokadaweryny (MDC), barwnika wnikającego do wnętrza komórek i lokalizującego się w wakuolach autofagowych (Ryc. 34). Uzyskane dane sugerują, że EGT skutecznie hamuje proces autofagii w komórkach HepG2.

Doniesienie o możliwości wykorzystania EGT w terapiach przeciwnowotworowych zainspirowało mnie do przeprowadzenia doświadczeń z wykorzystaniem leków o działaniu cytostatycznym. Leki cytostatyczne są to związki o zróżnicowanym mechanizmie działania, co umożliwia dobór odpowiedniego zestawu chemioterapeutyków do specyfiki lezonego nowotworu. Doksorubicyna (Dox) interkaluje do jądrowego DNA powodując jego uszkodzenie oraz inhibicję topoizomazy II, zaburzając tym samym cykl komórkowy i hamując podziały komórkowe [185]. Podobne działanie wykazuje cisplatyna (CisPt) tworząca addukty z jądrowym DNA [186].

Komórki linii HepG2 poddano działaniu wybranym chemioterapeutykami, wśród których znalazły się: doksorubicyna, cisplatyna, etopozyd, winkrystyna, metotreksat i mitoksantron. Preinkubacja komórek HepG2 z EGT wykazała modulację przeżywalności hodowli tylko po inkubacji z Dox i CisPt (Ryc. 35). 72-godzinna inkubacja z Dox w stężeniu 300 nmol/dm³ obniżyła przeżywalność komórek linii HepG2 o niespełna 60%, a zastosowanie preinkubacji

z EGT w stężeniu $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ spowodowało obniżenie działania cytotoksycznego Dox (Ryc. 35A). EGT w zależności od stężenia hamuje działanie cytostatyczne CisPt (Ryc. 35B).

Przegląd literatury w poszukiwaniu danych o toksyczności leków cytostatycznych na komórki linii HepG2 jest utrudniony z uwagi na powszechny w publikacjach brak informacji na temat stężenia D-glukozy w pożywce hodowlanej. Utrzymywanie komórek w stanie hiperglikemii prowadzi do znacznych zmian tempa metabolizmu, aktywności mitochondriów, modulacji szlaków sygnalizacyjnych itd. Dlatego też prowadząc hodowlę komórek HepG2 w pożywce zawierającej $25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ D-glukozy, należy mieć na uwadze jej wpływ na funkcjonowanie komórek, w szczególności metabolizm, gdyż zależy on od zawartości glukozy i insuliny w pożywce [187]. Nadal niestety w większości czasopism naukowych nie zwraca się uwagi na konieczność wpisania informacji o stężeniu glukozy w pożywce, uniemożliwiając wykorzystanie danych w celu porównawczym. Na podstawie własnego doświadczenia laboratoryjnego, przeprowadzonych badań pilotażowych oraz danych literaturowych stwierdzam, że komórki linii HepG2 hodowane w pożywce o wysokim stężeniu D-glukozy ($25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$) wykazują większą oporność na działanie leków cytostatycznych od komórek hodowanych w pożywce o fizjologicznym stężeniu ($5 \text{ mmol}/\text{dm}^3$) D-glukozy [188]. Przykładowo, hodowla komórek linii HepG2 utrzymywana w pożywce zawierającej $25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ D-glukozy, po 24 godzinach inkubacji z Dox ($80 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) osiąga 50% przeżywalność względem komórek kontrolnych [188]. Zbliżona jest toksyczność CisPt względem komórek linii HepG2 hodowanych w pożywce wysokoglukozowej – chemioterapeutyk w stężeniu $80 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ obniża przeżywalność o 50% po 24-godzinnej inkubacji [189]. Porównując te dane z wartościami dla komórek HepG2 hodowanych w pożywce o niskiej zawartości glukozy (Ryc. 35) można zauważyć dużą rozbieżność stężeń.

Toksyczność chemioterapeutyków zależy również m.in. od aktywności systemów eksportujących ksenobiotyki na zewnątrz komórki. Białka odpowiedzialne za eksport ksenobiotyków należą do rodziny transporterów ABC (ATP-binding cassette). Rodzina białek ABC to grupa wielodomenowych białek błonowych wykorzystująca energię z ATP do przenoszenia ksenobiotyków i substratów fizjologicznych w poprzek błony komórkowej.

Substratami transporterów ABC są np. leki cytostatyczne, barwniki, niesterydowe leki przeciwzapalne itd. Białka z rodziny ABC są odpowiedzialne za powstawanie tzw. zjawiska oporności wielolekowej (multidrug resistance; MDR), polegającego na obniżaniu skuteczności chemioterapii w zależności od aktywności i poziomu transporterów odpowiadających za wyrzut ksenobiotyków z komórek. Białka związane ze zjawiskiem

MDR to m.in. ABCB1, ABCC1 i ABCC2 (multidrug resistance protein) oraz ABCG2 [190]. Dane literaturowe wskazują, że Dox jest transportowana głównie przez transporter ABCB1 [191] natomiast za transport CisPt odpowiadają głównie ABCC1 [192] i ABCC2 [193,194].

Ekspresja genów kodujących transportery ABC może być modulowana przez szereg czynników takich jak stany chorobowe czy substancje pochodzenia egzogenego. W celu sprawdzenia czy EGT wykazuje zdolność do modulacji aktywności transporterów ABC przeprowadzono testy funkcjonalne aktywności wybranych białek ABC.

W celu oceny aktywności ABCB1 przeprowadzono test akumulacji kalceiny w komórkach HepG2 (Ryc. 36). W celu zahamowania aktywności transportera ABCB1 do połowy próbek dodano werapamil, który jest inhibitorem tego białka [195]. Komórki traktowane werapamilem osiągnęły wartości fluorescencji niższe od próbek kontrolnych, co oznacza, że werapamil spowodował mniejszą akumulację/szybszy transport na zewnątrz kalceiny w porównaniu do próby kontrolnej. Zgodnie z wykładnią literatury przedmiotu zastosowanie werapamilu powinno spowodować większą akumulację barwnika w komórkach, gdyż powoduje on inhibicję transportera ABCB1. Jednym z wyjaśnień obserwowanych danych może być sekwestracja barwnika w strukturach wewnątrzkomórkowych.

24-godzinna preinkubacja z EGT niezależnie od stężenia spowodowała istotne obniżenie akumulacji kalceiny względem komórek próby kontrolnej. Próbki preinkubowane z EGT i traktowane werapamilem wykazały najniższe wartości fluorescencji ze wszystkich badanych wariantów. Niższy poziom akumulacji barwnika po traktowaniu komórek EGT sugeruje, że EGT indukuje syntezę białek odpowiedzialnych za eksport kalceiny bądź w sposób pośredni przyczynia się do zwiększenia ogólnej aktywności transporterów ABC w komórkach HepG2. Możliwe, że EGT powoduje zwiększenie poziomu ABCB1. Obliczone wartości netto fluorescencji potwierdzają wpływ EGT na proces transportu ksenobiotyków na zewnątrz komórki.

Ocenę aktywności transportera ABCC1 przeprowadzono na drodze pomiaru funkcjonalnego z wykorzystaniem metody cytofluorymetrycznego pomiaru kinetyki akumulacji i wypływu barwnika Fluo3-AM z komórek HepG2 (Ryc. 37). W celu zahamowania aktywności transportera ABCC1 wykorzystano selektywny inhibitor MK571. Próbki traktowane inhibitorem MK571 osiągały wyższe wyniki intensywności fluorescencji, co przekłada się na wyższy wewnątrzkomórkowy poziom Fluo3. Stosunek importu do eksportu barwnika w komórkach nietraktowanych inhibitorem MK571 zaczął maleć po 20 minutach pomiaru. Szybkość wypływu była wyraźnie wyższa w komórkach

nietraktowanych inhibitorem MK571 w porównaniu do komórek, które traktowano inhibitorem MK571. Porównanie wyników netto powierzchni pod krzywą sugeruje, że możliwa jest modulacja kinetyki akumulacji i wypływu barwnika Fluo3-AM w komórkach traktowanych EGT. W celu potwierdzenia tego zjawiska przeprowadzono doświadczenie z wykorzystaniem barwnika BCECF-AM.

Doświadczenie z wykorzystaniem barwnika BCECF-AM wykazało, że komórki kontrolne wyładowywały barwnik najszybciej w porównaniu do innych prób z układu doświadczalnego (Ryc. 38). Zastosowanie inhibitora MK571 obniżyło szybkość eksportu BCECF a także przesunęło granicę maksymalnego poziomu akumulacji w komórkach. Aby porównać kinetykę wypływu obliczono powierzchnię pod krzywą netto dla prób w układzie doświadczalnym. Przeprowadzone obliczenia sugerują, że EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ moduluje aktywność transportera ABCC1.

Następnie przeprowadzono ocenę poziomu ekspresji genów kodujących białka z rodziny ABC, aby sprawdzić, czy obserwowane zmiany funkcjonalne są wynikiem wyższego poziomu transporterów w błonie czy indukcji ich aktywności. Poniżej przeprowadzono krótką charakterystykę genów, które zgodnie z uzyskanymi wynikami uległy modulacji przez EGT.

ABCA2 to gen kodujący transporter lipidów odpowiedzialny za regulację homeostazy cholesterolu i jego sekwestrację w późnych endosomach lub lizosomach [196]. *ABCA2* reguluje produkcję β -amyloidu poprzez modulację metabolizmu sfingolipidów lub na drodze szlaku przetwarzania białka prekursorowego β -amyloidu przez gamma-sekretazę [197,198].

Transporter kodowany przez gen *ABCC1*, czyli ABCC1, jest odpowiedzialny za wyrzut ksenobiotyków z komórki. Przyczynia się do powstawania oporności komórek nowotworowych na chemioterapię [199]. Poza tym uczestniczy w transporcie m.in. GSH i leukotrienu C4 [200] co może świadczyć o udziale ABCC1 w odpowiedzi immunologicznej poprzez eksport leukotrienu C4 z komórek go syntetyzujących [201].

Transporter ABCC6 pełni funkcję ATP-zależnego eksportera ksenobiotyków i koniugatów GSH, takich jak leukotrien C4 [202]. Pomimo przynależności do podrodziny C, transporter ABCC6 nie wykazuje dużego powinowactwa względem chemioterapeutyków, nadając komórkom niewielką oporność na etopozyd, tenipozyd, antracykliny i cisplatynę [202].

Ostatni z genów, które uległy indukcji pod wpływem EGT, to gen kodujący białko ABCC11 eksportujące fizjologiczne metabolity oraz ksenobiotyki [203]. Co ciekawe,

ABCC11 pełni funkcję transportera wypływu cAMP i cGMP, powodując tym samym zwiększenie odporności komórek na działanie cytostatyków o strukturze analogów cyklicznych nukleotydów np. 5'-fluorouracyl, 5'-fluoro-2'-deoksyurudyna czy fluoro-5'-deoksyurudyna [204]. ABCC11 jest również fizjologicznym transporterem kwasów żółciowych i steroidów [205].

EGT spowodowała również represję niektórych genów: *ABCB6*, *ABCC5* i *ABCF3*. Białko ABCB6 odpowiedzialne jest za transport porfiryn z cytoplazmy do przestrzeni międzykomórkowej [206]. Kiss i wsp. [207] wykazali obecność ABCB6 w endolizosomach oraz dojrzewających erytrocytach. ABCB6 może pełnić rolę importera w błonie mitochondrialnej, transportując porfiryny z cytoplazmy do wnętrza mitochondrium i przyczyniając się tym samym do modulacji biosyntezy hemu *de novo* [208]. W warunkach *in vitro* nadekspresja ABCB6 prowadzi do zwiększenia odporności komórek na metale ciężkie (np. arsen, kadm) i cytostatyki (np. 5'-fluorouracyl, winkrystyna) [209–211].

Transporter ABCC5 transportuje związki pochodzenia endogennego i ksenobiotyki. *In vitro* ABCC5 transportuje cAMP i cGMP oraz kwas foliowy [212]. Wykazano również, że w warunkach *in vitro* ABCC5 transportuje niektóre cytostatyki (np. metotreksat) oraz analogi nukleotydów, jednakże z bardzo niskim powinowactwem do tych cząsteczek [213,214]. Pełni funkcję transportera hemu dokonując translokacji hemu z cytozolu do jego szlaku wydzielniczego [215].

Natomiast transporter ABCF3 jest bardzo słabo poznanym białkiem. Badania przeprowadzone na wyizolowanym i oczyszczonym białku ABCF3 wykazały, że posiada on dwie domeny wiążące ATP o różnym stopniu powinowactwa do substratu [216]. Aktywność ABCF3 ulega indukcji w obecności lipidów takich jak sfingozyna, sfingomielina, czy lizofosfatydylocholina. Z kolei cholesterol powoduje inhibicję aktywności białka ABCF3.

Komórki HepG2 wyróżniają się na tle innych linii komórkowych wysoką konstytutywną ekspresją białka ABCC1 [217]. Zastosowanie preinkubacji komórek z EGT spowodowało indukcję ekspresji genu *ABCC1* (Ryc. 38). W celu dodatkowej weryfikacji zdolności EGT do modulacji ekspresji genu *ABCC1* przeprowadzono doświadczenia metodą western blot. Uzyskane dane potwierdziły wyniki analizy PCR (Ryc. 39A). Sugeruje to więc, że traktowanie komórek EGT w stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ powoduje nadekspresję genu *ABCC1* skutkującą indukcją syntezy białka ABCC1. Wskazują na to również wyniki testów funkcjonalnych (Ryc. 37-38), w których komórki traktowane EGT wykazywały wyniki odmienne od komórek kontrolnych. Nie zaobserwowano zmian w poziomie białka ABCC2

po preinkubacji z EGT. Uzyskane wyniki sugerują istnienie zależności pomiędzy preinkubacją komórek z EGT a poziomem białka ABCC1.

Wewnątrzkomórkowy wolny NO wykazuje wysokie powinowactwo względem jonów żelaza [218]. Wykazano, że w układach komórkowych NO tworzy przejściowe kompleksy z żelazem i GSH [219]. Wspomniane kompleksy złożone są z dwóch cząsteczek NO, atomu żelaza, dwóch atomów siarki z reszt tiolowych i aminokwasów lub niewielkich peptydów, które są donorem grupy tiolowej. Te kompleksy noszą nazwę kompleksów dinitrozylo-ditiolo-żelazowych (DNIC) [220]. Donorem grupy tiolowej w układach biologicznych jest najczęściej glutation lub cysteina. Kompleksy DNIC opisywane są w literaturze przedmiotu jako nietoksyczna i stabilna forma przechowywania tlenku azotu [221]. W tej formie okres półtrwania NO z sekund wydłuża się do godzin a powstawanie kompleksów jest bezpośrednio zależne od poziomu O_2 [222]. Egzogenne związki o działaniu chelatującym mogą prowadzić do degradacji DNIC, tym samym prowadząc do uwolnienia NO i m.in. aktywacji apoptozy [223]. EGT wykazuje, jak wspomniano wcześniej, właściwości chelatujące. Może to stanowić wyjaśnienie mechanizmu EGT, który poprzez działanie chelatujące kompleksuje jon żelaza znajdujący się w centrum kompleksu i kieruje DNIC do degradacji, prowadząc do uwolnienia NO. Jest to o tyle istotne, że DNIC są główną dostępną formą NO w komórkach [222], więc zaburzenie szlaku DNIC prowadzić może do szeregu zmian w komórce.

Zgodnie z danymi literaturowymi, NO-zależny eksport jonów żelaza z komórek wymaga obecności GSH oraz nakładów energii [224]. Kompleksy DNIC w komórkach nowotworowych transportowane są przez ABCC1, transporter wykazujący wysokie powinowactwo do GSH [225]. Komórki linii HepG2 traktowane EGT wykazują modulację indukcji genu *ABCC1* i poziomu białka ABCC1 (Ryc. 38-39). Wyciszenie genu *ABCC1* lub zastosowanie inhibitora MK571 powoduje inhibicję wyrzutu DNIC i jego wewnątrzkomórkową akumulację [226]. Co więcej, kinetyka eksportu DNIC jest zależna od ekspresji genu kodującego transporter ABCC1 [227]. Można więc przyjąć, że obserwowana modulacja ekspresji niektórych genów kodujących transportery ABC, w szczególności transportera ABCC1, jest wynikiem oddziaływania EGT na kompleksy DNIC. Prowadzi to do uwolnienia NO i przyłączonych do żelaza ligandów tiolowych. Uwolniony NO może prowadzić do modulacji szlaku cGMP na drodze przyłączania się do grupy hemowej cyklazy guanylowej [218], prowadząc do aktywacji syntezy cGMP [228].

Proces fizjologicznego powstawania DNIC w hepatocytach nie jest do końca jasny. Zaproponowano, że DNIC mogą powstawać w wyniku katalizowanej przez NO chelatacji

jonów żelaza pochodzących z ferrytyny lub transferryny [229]. Mechanizm zakłada przechwyt jonów żelaza przez NO po degradacji transferryny w endosomach [230] bądź ferrytyny w lizosomach [231]. Badania potwierdzają, że nie tylko degradacja lizosomalna ferrytyny, ale wszystkich metaloprotein umożliwia NO przechwycenie uwolnionego żelaza [232]. Koreluje z tym poziom metalotionein, który uległ obniżeniu po traktowaniu komórek HepG2 EGT (Ryc. 26). Intrygujące natomiast jest działanie EGT w komórkach traktowanych LPS, gdyż traktowanie komórek LPS powoduje obniżenie stężenia metalotionein (Ryc. 33A) podczas gdy traktowanie preinkubowanych z EGT komórek LPS zapobiega obniżeniu poziomu metalotionein. Możliwe, że jest to wynik działania stresu oksydacyjnego indukowanego przez LPS. Poziom metalotionein spada, gdyż reagują one z wytworzonymi przez LPS RFT/RFA. Natomiast gdy komórki są preinkubowane z EGT to zapobiega ona indukcji stresu oksydacyjnego oraz generacji RFT/RFA.

VIII. Podsumowanie

Przedstawione w niniejszej dysertacji wyniki wskazują nowe, dotychczas nieznane drogi działania ergotioneiny w komórkach nerwiaka zarodkowego oraz raka wątrobowokomórkowego.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że w warunkach *in vitro* ergotioneina jest dobrym związkami o działaniu antyoksydacyjnym. Ergotioneina nie ulega reakcjom charakterystycznym dla tioli z uwagi na występowanie ugrupowania tiomocznikowego na pierścieniu imidazolowym. Działa także w warunkach niskiego pH oraz nie ulega reakcji z jonami chromu.

W komórkach linii SH-SY5Y ergotioneina wykazała działanie chroniące komórki przed śmiercią indukowaną przez nadtlenek wodoru, tlenek azotu i nadtlenki organiczne. W niskich stężeniach (poniżej 125 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) ergotioneina nie powoduje generacji reaktywnych form tlenu. Ergotioneina wykazuje działanie antyoksydacyjne. Chroni komórki linii SH-SY5Y przed indukcją stresu oksydacyjnego wywoływanego przez modelowe związki utleniające.

Zastosowanie preinkubacji komórek z ergotioneiną i traktowanie niektórymi oksydantami prowadzi do wzmocnienia generacji reaktywnych form tlenu. Ergotioneina wykazuje więc interakcję ze związkami o działaniu utleniającym.

Wykazano, że ergotioneina działa antyapoptotycznie na komórki linii SH-SY5Y, zapobiegając aktywacji procesu apoptozy indukowanej przez związki o działaniu oksydacyjnym. Ponadto, wykazuje także działanie antyapoptotyczne względem indukcji

apoptozy niezależnie od stresu oksydacyjnego. W wyższych stężeniach ($200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) prowadzi do obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu ATP i nie wpływa na cykl komórkowy.

Ergotioneina prowadzi także do obniżenia ilości wewnątrzkomórkowych wakuol autofagowych, co może sugerować represję procesu autofagii przez ergotioneinę. W komórkach linii SH-SY5Y wykazuje również działanie modulujące szlak GSK3 oraz przejście epitelialno-mezenchymalne. Prowadzi do indukcji kinazy mTOR oraz represji poziomu białek ZO1 i ZEB1. Odnotowano również wpływ ergotioneiny na poziom fosforylacji inhibicyjnej białek GSK3 β oraz ULK1.

Zastosowanie suplementacji ergotioneiną w komórkach linii HepG2 wykazała, że zakres stężenia toksycznego ergotioneiny silnie zależy od modelu badawczego. Dla komórek linii HepG2 dobrano stężenia ergotioneiny równe 25 i $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Ergotioneina wykazała potencjał cytoprotekcyjny i antyoksydacyjny również względem komórek linii HepG2. Jednakże w odróżnieniu od linii SH-SY5Y, preinkubacja z ergotioneiną spowodowała w komórkach linii HepG2 indukcję tlenku azotu oraz redukcję endogennego poziomu reaktywnych form tlenu. Wspiera to teorię na temat działania antyoksydacyjne ergotioneiny. Suplementacja komórek ergotioneiną potwierdziła także tezę o cytoprotekcyjnym działaniu ergotioneiny – wykazano, że ergotioneina ogranicza spadek przeżywalności spowodowany działaniem niektórych chemioterapeutyków w komórkach linii HepG2.

Ergotioneina wykazała także działanie antyoksydacyjne względem endotoksyny jaką jest lipopolisacharyd. Ergotioneina w komórkach linii HepG2 wykazywała działanie ochronne względem niektórych leków przeciwnowotworowych na drodze indukcji ekspresji genu *ABCC1*. Otrzymane dane doprowadziły do sformułowania wniosku, że ergotioneina reaguje z wewnątrzkomórkowymi kompleksami dinitrozylo-ditiolo-żelazowymi, powodując skompleksowanie jonu żelaza i uwolnienie tlenku azotu.

Synteza uzyskanych danych wskazuje, że ergotioneina, z uwagi na zdolność do chelatowania jonów metali w komórkach eukariotycznych, indukuje sygnalizację zależną od tlenku azotu. Ergotioneina uwalnia tlenek azotu z kompleksów DNIC prowadząc do aktywacji szeregu szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej zależnej od tlenku azotu. Prowadzi to do nadekspresji białka oporności wielolekowej *ABCC1*, modulacji poziomu białka ZO1 odpowiadającego za połączenia międzykomórkowe oraz czynnika transkrypcyjnego ZEB1 aktywującego przejście EMT. Ergotioneina prezentuje również działanie antyapoptotyczne, antyoksydacyjne i zapobiegające działaniu cytotoksycznemu wywołanemu przez stres oksydacyjny i niektóre leki przeciwnowotworowe.

IX. Streszczenie

Ergotioneina jest jednym z wielu związków pochodzenia naturalnego, które wykazują działanie prozdrowotne w organizmach eukariotycznych. Kategoryzowana jest w gronie nutraceutyków ze względu na działanie antyoksydacyjne, zdolność do chelatowania jonów metali i wykazane działanie cytoprotekcyjne. Dodatkowo, ergotioneina charakteryzuje się aktywnym transportem do wnętrza komórek, wysoką biodostępnością oraz niskim stopniem wydalania z organizmu, co wynika z jej cyklicznej regeneracji, zależnej od glutationu. Ergotioneina wykazuje obiecujące działanie neuroprotekcyjne wobec ludzkich komórek nerwowych, choć mechanizm tego działania nie jest jeszcze w pełni zrozumiany. W związku z tym, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było sformułowanie odpowiedzi na hipotezę zakładającą, że ergotioneina może indukować efekt neuroprotekcyjny, pełniąc rolę cząsteczki sygnałowej.

Przeprowadzono badania oceniające potencjał antyoksydacyjny ergotioneiny w warunkach *in vitro*. Doświadczenia prowadzono na ludzkich komórkach nerwiaka zarodkowego linii SH-SY5Y, które były inkubowane z ergotioneiną i poddawane działaniu związków utleniających. Wykazano, że traktowanie komórek linii SH-SY5Y ergotioneiną prowadzi do modulacji białek markerowych przejścia epitelialno-mezenchymalnego oraz szlaku zależnego od kinazy mTOR. Dodatkowo, ergotioneina wpływa na szybkość fosforylacji białek p-GSK3 β (Ser9) i p-ULK1 (Ser758).

W ramach badań przeprowadzono także ocenę właściwości ochronnych i sygnalizacyjnych ergotioneiny w komórkach raka wątrobowokomórkowego linii HepG2. Preinkubacja komórek HepG2 z ergotioneiną prowadziła do indukcji generacji tlenu azotu. Co istotne, preinkubacja komórek linii HepG2 z ergotioneiną prowadziła do modulacji odpowiedzi komórek na działanie lipopolisacharydu. Przeprowadzone pomiary funkcjonalne i ocena poziomu białek oporności wielolekowej wykazały związek pomiędzy tlenkiem azotu a białkami ABCB1 i ABCC1. Wnioski płynące z tych badań wskazują, że ergotioneina, dzięki zdolności do chelatowania jonów metali, jest w stanie uwolnić tlenek azotu z kompleksów dinitrozo-ditiolo-żelazowych, co skutkuje aktywacją szlaków sygnalizacji zależnych od tlenu azotu.

Podsumowując, ergotioneina wykazuje działanie antyapoptotyczne, antyoksydacyjne i zdolność do zapobiegania działaniu cytotoksycznemu, które jest wywołane stresem oksydacyjnym oraz niektórymi lekami przeciwnowotworowymi. Jej zdolność do chelatowania jonów metali umożliwia modulację szlaków przekaźnictwa sygnałów zależnych od tlenu azotu, co sugeruje obiecujący potencjał tego związku w kontekście

działań prozdrowotnych. Ergotioneina może więc pełnić rolę cząsteczki sygnałowej m.in. poprzez pośrednią modulację aktywności szlaków sygnalizacyjnych zależnych od tlenku azotu.

X. Summary

Ergothioneine is one of compounds of natural origin that show health-promoting effects in eukaryotic organisms. It has been categorized as a nutraceutical, due to its antioxidant activity, ability to chelate metal ions and cytoprotective activity. In addition, ergothioneine is characterized by active transport into cells, high bioavailability, and low excretion from the body, because it can be regenerated in a glutathione-dependent cycle. Ergothioneine shows promising neuroprotective effects against human nerve cells, although the mechanism of this action is not yet fully understood. Therefore, the aim of this dissertation was to answer the hypothesis that ergothioneine can induce a neuroprotective effect by acting as a signaling molecule. Firstly, the antioxidant potential of ergothioneine under *in vitro* conditions has been evaluated. The, the experiments were conducted on human embryonal neuroblastoma cells of the SH-SY5Y cell line, which were incubated with ergothioneine and treated with compounds that induce oxidative stress. Treatment of SH-SY5Y cells with ergothioneine led to modulation of marker proteins of the epithelial-mesenchymal transition and the mTOR kinase-dependent pathway. In addition, ergothioneine affected the rate of phosphorylation of p-GSK3 β (Ser9) and p-ULK1 (Ser758) proteins. The study also evaluated the protective and signaling properties of ergothioneine in hepatocellular carcinoma cells of the HepG2 lineage. Preincubation of HepG2 cells with ergothioneine led to induction of nitric oxide generation. Importantly, preincubation of HepG2 cells with ergothioneine led to modulation of the cellular response to lipopolysaccharide. Functional measurements and evaluation of the level of multidrug resistance proteins showed a link between nitric oxide generation and ABCB1 and ABCC1 proteins level. These indicates that ergothioneine, due to its ability to chelate metal ions, is able to release nitric oxide from dinitroso-dithiol-iron complexes, resulting in the activation of nitric oxide-dependent signaling pathways.

In summary, ergothioneine exhibits anti-apoptotic, antioxidant activity and the ability to prevent cytotoxic effects that are induced by oxidative stress and some anticancer drugs. Its ability to chelate metal ions enables modulation of nitric oxide-dependent signal transduction pathways, suggesting the promising potential of this compound in the context of health-promoting activities. Ergothioneine may thus act as a signaling molecule via indirect modulation of the activity of nitric oxide-dependent signaling pathways.

XI. Bibliografia

1. Grundemann, D.; Harlfinger, S.; Golz, S.; Geerts, A.; Lazar, A.; Berkels, R.; Jung, N.; Rubbert, A.; Schomig, E. Discovery of the Ergothioneine Transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, doi:10.1073/pnas.0408624102.
2. Oumari, M.; Goldfuss, B.; Stoffels, C.; Schmalz, H.-G.; Gründemann, D. Regeneration of Ergothioneine after Reaction with Singlet Oxygen. *Free Radic Biol Med* **2019**, *134*, 498–504, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.043.
3. Cheah, I.K.; Halliwell, B. Ergothioneine; Antioxidant Potential, Physiological Function and Role in Disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2012**, *1822*, doi:10.1016/j.bbadis.2011.09.017.
4. Beelman, R.B.; Kalaras, M.D.; Phillips, A.T.; Richie, J.P. Is Ergothioneine a ‘Longevity Vitamin’ Limited in the American Diet? *J Nutr Sci* **2020**, *9*, e52, doi:10.1017/jns.2020.44.
5. Tanret, C. A New Base Taken from Rye Ergot, Ergothioneine. *Annales de Chimie et de Physique* **1909**, *18*, 114–124.
6. Cheah, I.K.; Tang, R.M.Y.; Yew, T.S.Z.; Lim, K.H.C.; Halliwell, B. Administration of Pure Ergothioneine to Healthy Human Subjects: Uptake, Metabolism, and Effects on Biomarkers of Oxidative Damage and Inflammation. *Antioxid Redox Signal* **2017**, *26*, doi:10.1089/ars.2016.6778.
7. Kawano, H.; Otani, M.; Takeyama, K.; Kawai, Y.; Mayumi, T.; Hama, T. Studies on Ergothioneine. VI. Distribution and Fluctuations of Ergothioneine in Rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1982**, *30*, 1760–1765, doi:10.1248/cpb.30.1760.
8. Motohashi, N.; Mori, I.; Sugiura, Y. Complexing of Copper Ion by Ergothioneine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1976**, *24*, 2364–2368, doi:10.1248/cpb.24.2364.
9. Zhu, B.-Z.; Mao, L.; Fan, R.-M.; Zhu, J.-G.; Zhang, Y.-N.; Wang, J.; Kalyanaraman, B.; Frei, B. Ergothioneine Prevents Copper-Induced Oxidative Damage to DNA and Protein by Forming a Redox-Inactive Ergothioneine–Copper Complex. *Chem Res Toxicol* **2011**, *24*, doi:10.1021/tx100214t.
10. Pochini, L.; Galluccio, M.; Scalise, M.; Console, L.; Pappacoda, G.; Indiveri, C. OCTN1: A Widely Studied but Still Enigmatic Organic Cation Transporter Linked to Human Pathology and Drug Interactions. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 914, doi:10.3390/ijms23020914.
11. Nakamichi, N.; Kato, Y. Physiological Roles of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1/SLC22A4 in Neural Cells. *Biol Pharm Bull* **2017**, *40*, doi:10.1248/bpb.b17-00099.
12. Ishimoto, T.; Kato, Y. Ergothioneine in the Brain. *FEBS Lett* **2022**, doi:10.1002/1873-3468.14271.
13. Melville, D.B. Ergothioneine. In *Vitamins & Hormones*; 1959; pp. 155–204.
14. Genghof, D.S.; Inamine, E.; Kovalenko, V.; Melville, D.B. Ergothioneine in Microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* **1956**, *223*, 9–17.
15. Cumming, B.M.; Chinta, K.C.; Reddy, V.P.; Steyn, A.J.C. Role of Ergothioneine in Microbial Physiology and Pathogenesis. *Antioxid Redox Signal* **2018**, *28*, 431–444, doi:10.1089/ars.2017.7300.
16. Borodina, I.; Kenny, L.C.; McCarthy, C.M.; Paramasivan, K.; Pretorius, E.; Roberts, T.J.; van der Hoek, S.A.; Kell, D.B. The Biology of Ergothioneine, an Antioxidant Nutraceutical. *Nutr Res Rev* **2020**, *33*, doi:10.1017/S0954422419000301.
17. Halliwell, B.; Cheah, I.K.; Tang, R.M.Y. Ergothioneine – a Diet-derived Antioxidant with Therapeutic Potential. *FEBS Lett* **2018**, *592*, doi:10.1002/1873-3468.13123.
18. Wang, Y.; Gapstur, S.M.; Carter, B.D.; Hartman, T.J.; Stevens, V.L.; Gaudet, M.M.; McCullough, M.L. Untargeted Metabolomics Identifies Novel Potential Biomarkers of

- Habitual Food Intake in a Cross-Sectional Study of Postmenopausal Women. *J Nutr* **2018**, *148*, 932–943, doi:10.1093/jn/nxy027.
19. Liang, C.-H.; Ho, K.-J.; Huang, L.-Y.; Tsai, C.-H.; Lin, S.-Y.; Mau, J.-L. Antioxidant Properties of Fruiting Bodies, Mycelia, and Fermented Products of the Culinary-Medicinal King Oyster Mushroom, *Pleurotus Eryngii* (Higher Basidiomycetes), with High Ergothioneine Content. *Int J Med Mushrooms* **2013**, *15*, 267–275, doi:10.1615/IntJMedMushr.v15.i3.40.
 20. Lin, S.-Y.; Chien, S.-C.; Wang, S.-Y.; Mau, J.-L. Nonvolatile Taste Components and Antioxidant Properties of Fruiting Body and Mycelium with High Ergothioneine Content from the Culinary-Medicinal Golden Oyster Mushroom *Pleurotus Citrinopileatus* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms* **2016**, *18*, 689–698, doi:10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i8.50.
 21. Dubost, N.; Ou, B.; Beelman, R. Quantification of Polyphenols and Ergothioneine in Cultivated Mushrooms and Correlation to Total Antioxidant Capacity. *Food Chem* **2007**, *105*, 727–735, doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.030.
 22. Dubost, N.J.; Beelman, R.B.; Royse, D.J. Influence of Selected Cultural Factors and Postharvest Storage on Ergothioneine Content of Common Button Mushroom *Agaricus Bisporus* (J. Lge) Imbach (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms* **2007**, *9*, 163–176, doi:10.1615/IntJMedMushr.v9.i2.70.
 23. Kalaras, M.D.; Richie, J.P.; Calcagnotto, A.; Beelman, R.B. Mushrooms: A Rich Source of the Antioxidants Ergothioneine and Glutathione. *Food Chem* **2017**, *233*, 429–433, doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.109.
 24. Garay, A. ST. Role of Ergothioneine and Catalase in Infection by Ergot Fungus (*Claviceps Purpurea* Tul.). *Nature* **1956**, *177*, 91–92, doi:10.1038/177091b0.
 25. Nakajima, S.; Satoh, Y.; Yanashima, K.; Matsui, T.; Dairi, T. Ergothioneine Protects *Streptomyces Coelicolor* A3(2) from Oxidative Stresses. *J Biosci Bioeng* **2015**, *120*, 294–298, doi:10.1016/j.jbiosc.2015.01.013.
 26. Sao Emani, C.; Williams, M.J.; Wiid, I.J.; Hiten, N.F.; Viljoen, A.J.; Pietersen, R.-D.D.; van Helden, P.D.; Baker, B. Ergothioneine Is a Secreted Antioxidant in *Mycobacterium Smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57*, 3202–3207, doi:10.1128/AAC.02572-12.
 27. Sheridan, K.J.; Lechner, B.E.; Keeffe, G.O.; Keller, M.A.; Werner, E.R.; Lindner, H.; Jones, G.W.; Haas, H.; Doyle, S. Ergothioneine Biosynthesis and Functionality in the Opportunistic Fungal Pathogen, *Aspergillus Fumigatus*. *Sci Rep* **2016**, *6*, 35306, doi:10.1038/srep35306.
 28. Kitsanayanyong, L.; Ohshima, T. Ergothioneine: A Potential Antioxidative and Antimelanosis Agent for Food Quality Preservation. *FEBS Lett* **2022**, doi:10.1002/1873-3468.14267.
 29. Turck, D.; Bresson, J.; Burlingame, B.; Dean, T.; Fairweather-Tait, S.; Heinonen, M.; Hirsch-Ernst, K.I.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H.J.; Naska, A.; et al. Safety of Synthetic L-ergothioneine (Ergoneine®) as a Novel Food Pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal* **2016**, *14*, doi:10.2903/j.efsa.2016.4629.
 30. Turck, D.; Bresson, J.; Burlingame, B.; Dean, T.; Fairweather-Tait, S.; Heinonen, M.; Hirsch-Ernst, K.I.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H.J.; Naska, A.; et al. Statement on the Safety of Synthetic L-ergothioneine as a Novel Food – Supplementary Dietary Exposure and Safety Assessment for Infants and Young Children, Pregnant and Breastfeeding Women. *EFSA Journal* **2017**, *15*, doi:10.2903/j.efsa.2017.5060.
 31. Federal Food and Drug Agency GRAS Notice 000734: Ergothioneine Available online: <https://www.fda.gov/media/112276/download> (accessed on 3 May 2023).

32. Forster, R.; Spézia, F.; Papineau, D.; Sabadie, C.; Erdelmeier, I.; Moutet, M.; Yadan, J.-C. Reproductive Safety Evaluation of L-Ergothioneine. *Food and Chemical Toxicology* **2015**, *80*, 85–91, doi:10.1016/j.fct.2015.02.019.
33. Schauss, A.G.; Béres, E.; Vértesi, A.; Frank, Z.; Pasics, I.; Endres, J.; Aruoma, O.I.; Hirka, G. The Effect of Ergothioneine on Clastogenic Potential and Mutagenic Activity. *Int J Toxicol* **2011**, *30*, 405–409, doi:10.1177/1091581811405856.
34. Schauss, A.G.; Vértesi, A.; Endres, J.R.; Hirka, G.; Clewell, A.; Qureshi, I.; Pasics, I. Evaluation of the Safety of the Dietary Antioxidant Ergothioneine Using the Bacterial Reverse Mutation Assay. *Toxicology* **2010**, *278*, 39–45, doi:10.1016/j.tox.2010.07.015.
35. Reinhold, V.N.; Ishikawa, Y.; Melville, D.B. Conversion of Histidine to Hercynine by *Neurospora Crassa*. *J Bacteriol* **1970**, *101*, 881–884, doi:10.1128/jb.101.3.881-884.1970.
36. Ishikawa, Y.; Israel, S.E.; Melville, D.B. Participation of an Intermediate Sulfoxide in the Enzymatic Thiolation of the Imidazole Ring of Hercynine to Form Ergothioneine. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, *249*, 4420–4427, doi:10.1016/S0021-9258(19)42435-6.
37. Naowarajna, N.; Cheng, R.; Chen, L.; Quill, M.; Xu, M.; Zhao, C.; Liu, P. Mini-Review: Ergothioneine and Ovothiols Biosyntheses, an Unprecedented Trans-Sulfur Strategy in Natural Product Biosynthesis. *Biochemistry* **2018**, *57*, 3309–3325, doi:10.1021/acs.biochem.8b00239.
38. Hoek, S.A.; Rusnák, M.; Jacobsen, I.H.; Martínez, J.L.; Kell, D.B.; Borodina, I. Engineering Ergothioneine Production in *Yarrowia Lipolytica*. *FEBS Lett* **2022**, *596*, 1356–1364, doi:10.1002/1873-3468.14239.
39. Akanmu, D.; Cecchini, R.; Aruoma, O.I.; Halliwell, B. The Antioxidant Action of Ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* **1991**, *288*, doi:10.1016/0003-9861(91)90158-F.
40. Sao Emani, C.; Williams, M.J.; Van Helden, P.D.; Taylor, M.J.C.; Carolis, C.; Wiid, I.J.; Baker, B. Generation and Characterization of Thiol-Deficient Mycobacterium Tuberculosis Mutants. *Sci Data* **2018**, *5*, 180184, doi:10.1038/sdata.2018.184.
41. Pluskal, T.; Ueno, M.; Yanagida, M. Genetic and Metabolomic Dissection of the Ergothioneine and Selenoneine Biosynthetic Pathway in the Fission Yeast, *S. Pombe*, and Construction of an Overproduction System. *PLoS One* **2014**, *9*, e97774, doi:10.1371/journal.pone.0097774.
42. Fujitani, Y.; Alamgir, K.M.; Tani, A. Ergothioneine Production Using Methylobacterium Species, Yeast, and Fungi. *J Biosci Bioeng* **2018**, *126*, 715–722, doi:10.1016/j.jbiosc.2018.05.021.
43. Osawa, R.; Kamide, T.; Satoh, Y.; Kawano, Y.; Ohtsu, I.; Dairi, T. Heterologous and High Production of Ergothioneine in *Escherichia Coli*. *J Agric Food Chem* **2018**, *66*, 1191–1196, doi:10.1021/acs.jafc.7b04924.
44. Tanaka, N.; Kawano, Y.; Satoh, Y.; Dairi, T.; Ohtsu, I. Gram-Scale Fermentative Production of Ergothioneine Driven by Overproduction of Cysteine in *Escherichia Coli*. *Sci Rep* **2019**, *9*, 1895, doi:10.1038/s41598-018-38382-w.
45. Tamai, I.; Yabuuchi, H.; Nezu, J.; Sai, Y.; Oku, A.; Shimane, M.; Tsuji, A. Cloning and Characterization of a Novel Human PH-Dependent Organic Cation Transporter, OCTN1. *FEBS Lett* **1997**, *419*, 107–111, doi:10.1016/S0014-5793(97)01441-5.
46. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589, doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
47. Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively

- Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models. *Nucleic Acids Res* **2022**, *50*, D439–D444, doi:10.1093/nar/gkab1061.
48. Lang, R.; Lang, T.; Bader, M.; Beusch, A.; Schlagbauer, V.; Hofmann, T. High-Throughput Quantitation of Proline Betaine in Foods and Suitability as a Valid Biomarker for Citrus Consumption. *J Agric Food Chem* **2017**, *65*, 1613–1619, doi:10.1021/acs.jafc.6b05824.
 49. Pochini, L.; Scalise, M.; Galluccio, M.; Pani, G.; Siminovitch, K.A.; Indiveri, C. The Human OCTN1 (SLC22A4) Reconstituted in Liposomes Catalyzes Acetylcholine Transport Which Is Defective in the Mutant L503F Associated to the Crohn's Disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2012**, *1818*, 559–565, doi:10.1016/j.bbamem.2011.12.014.
 50. Engelhart, D.C.; Granados, J.C.; Shi, D.; Saier Jr., M.H.; Baker, M.E.; Abagyan, R.; Nigam, S.K. Systems Biology Analysis Reveals Eight SLC22 Transporter Subgroups, Including OATs, OCTs, and OCTNs. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 1791, doi:10.3390/ijms21051791.
 51. Masuo, Y.; Ohba, Y.; Yamada, K.; Al-Shammari, A.H.; Seba, N.; Nakamichi, N.; Ogihara, T.; Kunishima, M.; Kato, Y. Combination Metabolomics Approach for Identifying Endogenous Substrates of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1. *Pharm Res* **2018**, *35*, 224, doi:10.1007/s11095-018-2507-1.
 52. Koepsell, H. Update on Drug-Drug Interaction at Organic Cation Transporters: Mechanisms, Clinical Impact, and Proposal for Advanced *in Vitro* Testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2021**, *17*, 635–653, doi:10.1080/17425255.2021.1915284.
 53. Tucker, R.A.J.; Cheah, I.K.; Halliwell, B. Specificity of the Ergothioneine Transporter Natively Expressed in HeLa Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2019**, *513*, 22–27, doi:10.1016/j.bbrc.2019.02.122.
 54. Urban, T.; Brown, C.; Castro, R.; Shah, N.; Mercer, R.; Huang, Y.; Brett, C.; Burchard, E.; Giacomini, K. Effects of Genetic Variation in the Novel Organic Cation Transporter, OCTN1, on the Renal Clearance of Gabapentin. *Clin Pharmacol Ther* **2008**, *83*, 416–421, doi:10.1038/sj.clpt.6100271.
 55. Nakamichi, N.; Shima, H.; Asano, S.; Ishimoto, T.; Sugiura, T.; Matsubara, K.; Kusuvara, H.; Sugiyama, Y.; Sai, Y.; Miyamoto, K.; et al. Involvement of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1/SLC22A4 in Gastrointestinal Absorption of Metformin. *J Pharm Sci* **2013**, *102*, 3407–3417, doi:10.1002/jps.23595.
 56. Akamine, T.; Koyanagi, S.; Kusunose, N.; Hashimoto, H.; Taniguchi, M.; Matsunaga, N.; Ohdo, S. Dosing Time-Dependent Changes in the Analgesic Effect of Pregabalin on Diabetic Neuropathy in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2015**, *354*, 65–72, doi:10.1124/jpet.115.223891.
 57. O'Hagan, S.; Wright Muelas, M.; Day, P.J.; Lundberg, E.; Kell, D.B. GeneGini: Assessment via the Gini Coefficient of Reference “Housekeeping” Genes and Diverse Human Transporter Expression Profiles. *Cell Syst* **2018**, *6*, 230-244.e1, doi:10.1016/j.cels.2018.01.003.
 58. Thul, P.J.; Åkesson, L.; Wiking, M.; Mahdessian, D.; Geladaki, A.; Ait Blal, H.; Alm, T.; Asplund, A.; Björk, L.; Breckels, L.M.; et al. A Subcellular Map of the Human Proteome. *Science (1979)* **2017**, *356*, doi:10.1126/science.aal3321.
 59. Billington, S.; Salphati, L.; Hop, C.E.C.A.; Chu, X.; Evers, R.; Burdette, D.; Rowbottom, C.; Lai, Y.; Xiao, G.; Humphreys, W.G.; et al. Interindividual and Regional Variability in Drug Transporter Abundance at the Human Blood–Brain Barrier Measured by Quantitative Targeted Proteomics. *Clin Pharmacol Ther* **2019**, *106*, 228–237, doi:10.1002/cpt.1373.
 60. Nakamichi, N.; Nakayama, K.; Ishimoto, T.; Masuo, Y.; Wakayama, T.; Sekiguchi, H.; Sutoh, K.; Usumi, K.; Iseki, S.; Kato, Y. Food-derived Hydrophilic Antioxidant

- Ergothioneine Is Distributed to the Brain and Exerts Antidepressant Effect in Mice. *Brain Behav* **2016**, *6*, doi:10.1002/brb3.477.
61. Kato, Y.; Kubo, Y.; Iwata, D.; Kato, S.; Sudo, T.; Sugiura, T.; Kagaya, T.; Wakayama, T.; Hirayama, A.; Sugimoto, M.; et al. Gene Knockout and Metabolome Analysis of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1. *Pharm Res* **2010**, *27*, doi:10.1007/s11095-010-0076-z.
 62. Yamase, Y.; Horibe, H.; Ueyama, C.; Fujimaki, T.; Oguri, M.; Kato, K.; Arai, M.; Watanabe, S.; Yamada, Y. Association of TOMM40 and SLC22A4 Polymorphisms with Ischemic Stroke. *Biomed Rep* **2015**, *3*, 491–498, doi:10.3892/br.2015.457.
 63. Ben Said, M.; Grati, M.; Ishimoto, T.; Zou, B.; Chakchouk, I.; Ma, Q.; Yao, Q.; Hammami, B.; Yan, D.; Mittal, R.; et al. A Mutation in SLC22A4 Encoding an Organic Cation Transporter Expressed in the Cochlea Strial Endothelium Causes Human Recessive Non-Syndromic Hearing Loss DFNB60. *Hum Genet* **2016**, *135*, 513–524, doi:10.1007/s00439-016-1657-7.
 64. Maeda, T.; Hirayama, M.; Kobayashi, D.; Miyazawa, K.; Tamai, I. Mechanism of the Regulation of Organic Cation/Carnitine Transporter 1 (*SLC22A4*) by Rheumatoid Arthritis-Associated Transcriptional Factor RUNX1 and Inflammatory Cytokines. *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35*, 394–401, doi:10.1124/dmd.106.012112.
 65. Jung, E.S.; Park, H.J.; Kong, K.A.; Choi, J.H.; Cheon, J.H. Association Study between *OCTN1* Functional Haplotypes and Crohn’s Disease in a Korean Population. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* **2017**, *21*, 11, doi:10.4196/kjpp.2017.21.1.11.
 66. Nakamura, T.; Sugiura, S.; Kobayashi, D.; Yoshida, K.; Yabuuchi, H.; Aizawa, S.; Maeda, T.; Tamai, I. Decreased Proliferation and Erythroid Differentiation of K562 Cells by siRNA-Induced Depression of OCTN1 (SLC22A4) Transporter Gene. *Pharm Res* **2007**, *24*, 1628–1635, doi:10.1007/s11095-007-9290-8.
 67. Shinozaki, Y.; Furuichi, K.; Toyama, T.; Kitajima, S.; Hara, A.; Iwata, Y.; Sakai, N.; Shimizu, M.; Kaneko, S.; Isozumi, N.; et al. Impairment of the Carnitine/Organic Cation Transporter 1–Ergothioneine Axis Is Mediated by Intestinal Transporter Dysfunction in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* **2017**, *92*, 1356–1369, doi:10.1016/j.kint.2017.04.032.
 68. Paul, B.D.; Snyder, S.H. The Unusual Amino Acid L-Ergothioneine Is a Physiologic Cytoprotectant. *Cell Death Differ* **2010**, *17*, 1134–1140, doi:10.1038/cdd.2009.163.
 69. Lin, L.; Yee, S.W.; Kim, R.B.; Giacomini, K.M. SLC Transporters as Therapeutic Targets: Emerging Opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14*, 543–560, doi:10.1038/nrd4626.
 70. Halliwell, B.; Tang, R.M.Y.; Cheah, I.K. Diet-Derived Antioxidants: The Special Case of Ergothioneine. *Annu Rev Food Sci Technol* **2023**, *14*, 323–345, doi:10.1146/annurev-food-060822-122236.
 71. Teruya, T.; Chaleckis, R.; Takada, J.; Yanagida, M.; Kondoh, H. Diverse Metabolic Reactions Activated during 58-Hr Fasting Are Revealed by Non-Targeted Metabolomic Analysis of Human Blood. *Sci Rep* **2019**, *9*, 854, doi:10.1038/s41598-018-36674-9.
 72. Cheah, I.K.; Feng, L.; Tang, R.M.Y.; Lim, K.H.C.; Halliwell, B. Ergothioneine Levels in an Elderly Population Decrease with Age and Incidence of Cognitive Decline; a Risk Factor for Neurodegeneration? *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *478*, doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.074.
 73. Wang, L.-Z.; Thuya, W.-L.; Toh, D.S.-L.; Lie, M.G.-L.; Lau, J.-Y.A.; Kong, L.-R.; Wan, S.-C.; Chua, K.-N.; Lee, E.J.-D.; Goh, B.-C. Quantification of L-Ergothioneine in Human Plasma and Erythrocytes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *48*, 406–412, doi:10.1002/jms.3150.

74. Tang, R.M.Y.; Cheah, I.K.-M.; Yew, T.S.K.; Halliwell, B. Distribution and Accumulation of Dietary Ergothioneine and Its Metabolites in Mouse Tissues. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-20021-z.
75. Ulrich, K.; Jakob, U. The Role of Thiols in Antioxidant Systems. *Free Radic Biol Med* **2019**, *140*, 14–27, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035.
76. Herrmann, J.M.; Dick, T.P. Redox Biology on the Rise. *bchm* **2012**, *393*, 999–1004, doi:10.1515/hsz-2012-0111.
77. Butterfield, D.A.; Halliwell, B. Oxidative Stress, Dysfunctional Glucose Metabolism and Alzheimer Disease. *Nat Rev Neurosci* **2019**, *20*, 148–160, doi:10.1038/s41583-019-0132-6.
78. Servillo, L.; D’Onofrio, N.; Casale, R.; Cautela, D.; Giovane, A.; Castaldo, D.; Balestrieri, M.L. Ergothioneine Products Derived by Superoxide Oxidation in Endothelial Cells Exposed to High-Glucose. *Free Radic Biol Med* **2017**, *108*, 8–18, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.009.
79. Servillo, L.; Castaldo, D.; Casale, R.; D’Onofrio, N.; Giovane, A.; Cautela, D.; Balestrieri, M.L. An Uncommon Redox Behavior Sheds Light on the Cellular Antioxidant Properties of Ergothioneine. *Free Radic Biol Med* **2015**, *79*, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.017.
80. Whiteman, M.; Halliwell, B. Thiols and Disulphides Can Aggravate Peroxynitrite-Dependent Inactivation of α_1 -Antiproteinase. *FEBS Lett* **1997**, *414*, 497–500, doi:10.1016/S0014-5793(97)01058-2.
81. Motohashi, N.; Mori, I.; Sugiura, Y.; Tanaka, H. Metal Complexes of Ergothioneine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1974**, *22*, 654–657, doi:10.1248/cpb.22.654.
82. Hanlon, D.P. Interaction of Ergothioneine with Metal Ions and Metalloenzymes. *J Med Chem* **1971**, *14*, 1084–1087, doi:10.1021/jm00293a017.
83. Rai, R.K.; Chalana, A.; Karri, R.; Das, R.; Kumar, B.; Roy, G. Role of Hydrogen Bonding by Thiones in Protecting Biomolecules from Copper(I)-Mediated Oxidative Damage. *Inorg Chem* **2019**, *58*, 6628–6638, doi:10.1021/acs.inorgchem.8b03212.
84. Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin Sci* **1993**, *84*, 407–412, doi:10.1042/cs0840407.
85. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* **1996**, *239*, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292.
86. Präbst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hübner, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In; 2017; pp. 1–17.
87. Fotakis, G.; Timbrell, J.A. In Vitro Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride. *Toxicol Lett* **2006**, *160*, 171–177, doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
88. Trayner, I.D.; Rayner, A.P.; Freeman, G.E.; Farzaneh, F. Quantitative Multiwell Myeloid Differentiation Assay Using Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (H2DCF-DA) or Dihydrorhodamine 123 (H2R123). *J Immunol Methods* **1995**, *186*, 275–284, doi:10.1016/0022-1759(95)00152-Z.
89. Zanetti, M.; d’Uscio, L. V.; Peterson, T.E.; Katusic, Z.S.; O’Brien, T. Analysis of Superoxide Anion Production in Tissue. In *Hypertension*; Humana Press: New Jersey; pp. 065–072.
90. Itoh, Y.; Ma, F.H.; Hoshi, H.; Oka, M.; Noda, K.; Ukai, Y.; Kojima, H.; Nagano, T.; Toda, N. Determination and Bioimaging Method for Nitric Oxide in Biological Specimens by Diaminofluorescein Fluorometry. *Anal Biochem* **2000**, *287*, 203–209, doi:10.1006/abio.2000.4859.

91. Krishan, A. Rapid Flow Cytofluorometric Analysis of Mammalian Cell Cycle by Propidium Iodide Staining. *Journal of Cell Biology* **1975**, *66*, 188–193, doi:10.1083/jcb.66.1.188.
92. Stirling, D.R.; Swain-Bowden, M.J.; Lucas, A.M.; Carpenter, A.E.; Cimini, B.A.; Goodman, A. CellProfiler 4: Improvements in Speed, Utility and Usability. *BMC Bioinformatics* **2021**, *22*, 433, doi:10.1186/s12859-021-04344-9.
93. Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, R. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: An Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Mar Environ Res* **1997**, *44*, 69–84, doi:10.1016/S0141-1136(96)00103-1.
94. Biederbick, A.; Kern, H.F.; Elsässer, H.P. Monodansylcadaverine (MDC) Is a Specific in Vivo Marker for Autophagic Vacuoles. *Eur J Cell Biol* **1995**, *66*, 3–14.
95. Vázquez, C.L.; Colombo, M.I. Chapter 6 Assays to Assess Autophagy Induction and Fusion of Autophagic Vacuoles with a Degradative Compartment, Using Monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. In; 2009; pp. 85–95.
96. Homolya, L.; Holló, M.; Müller, M.; Mechetner, E.; Sarkadi, B. A New Method for Quantitative Assessment of P-Glycoprotein-Related Multidrug Resistance in Tumour Cells. *Br J Cancer* **1996**, *73*, 849–855, doi:10.1038/bjc.1996.151.
97. Wall, D.M.; Hu, X.F.; Nadalin, G.; Zalcborg, J.R.; Parkin, J.D.; Sparrow, R.; Van der Weyden, M.; Marschner, I.C. Clinical Application of a Rapid, Functional Assay for Multidrug Resistance Based on Accumulation of the Fluorescent Dye, Fluo-3. *Eur J Cancer* **1993**, *29*, 1024–1027, doi:10.1016/S0959-8049(05)80216-3.
98. Versantvoort, C.H.M.; Broxterman, H.J.; Feller, N.; Dekker, H.; Kuiper, C.M.; Lankelma, J. Probing Daunorubicin Accumulation Defects in Non-P-glycoprotein Expressing Multidrug-resistant Cell Lines Using Digitonin. *Int J Cancer* **1992**, *50*, 906–911, doi:10.1002/ijc.2910500615.
99. Yoshida, S.; Shime, H.; Funami, K.; Takaki, H.; Matsumoto, M.; Kasahara, M.; Seya, T. The Anti-Oxidant Ergothioneine Augments the Immunomodulatory Function of TLR Agonists by Direct Action on Macrophages. *PLoS One* **2017**, *12*, e0169360, doi:10.1371/journal.pone.0169360.
100. Lu, Y.-C.; Yeh, W.-C.; Ohashi, P.S. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine* **2008**, *42*, 145–151, doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006.
101. Hsiao, C.-C.; Chen, P.-H.; Cheng, C.-I.; Tsai, M.-S.; Chang, C.-Y.; Lu, S.-C.; Hsieh, M.-C.; Lin, Y.-C.; Lee, P.-H.; Kao, Y.-H. Toll-like Receptor-4 Is a Target for Suppression of Proliferation and Chemoresistance in HepG2 Hepatoblastoma Cells. *Cancer Lett* **2015**, *368*, 144–152, doi:10.1016/j.canlet.2015.08.004.
102. Spicer, S.S.; Wooley, J.G.; Kessler, V. Ergothioneine Depletion in Rabbit Erythrocytes and Its Effect on Methemoglobin Formation and Reversion. *Exp Biol Med* **1951**, *77*, 418–420, doi:10.3181/00379727-77-18799.
103. Xu, X.-R.; Li, H.-B.; Li, X.-Y.; Gu, J.-D. Reduction of Hexavalent Chromium by Ascorbic Acid in Aqueous Solutions. *Chemosphere* **2004**, *57*, 609–613, doi:10.1016/j.chemosphere.2004.07.031.
104. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Deemer, E.K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 3122–3128, doi:10.1021/jf0116606.
105. Hartman, P.E. Ergothioneine as Antioxidant. In; 1990.

106. Aruoma, O.I.; Spencer, J.P.E.; Mahmood, N. Protection Against Oxidative Damage and Cell Death by the Natural Antioxidant Ergothioneine. *Food and Chemical Toxicology* **1999**, *37*, doi:10.1016/S0278-6915(99)00098-8.
107. Reglinski, J.; Smith, W.E.; Sturrock, R.D. Spin-echo ¹ H NMR Detected Response of Ergothioneine to Oxidative Stress in the Intact Human Erythrocyte. *Magn Reson Med* **1988**, *6*, 217–223, doi:10.1002/mrm.1910060210.
108. Pervin, S.; Singh, R.; Chaudhuri, G. Nitric Oxide-Induced Cytostasis and Cell Cycle Arrest of a Human Breast Cancer Cell Line (MDA-MB-231): Potential Role of Cyclin D1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 3583–3588, doi:10.1073/pnas.041603998.
109. Chaleckis, R.; Murakami, I.; Takada, J.; Kondoh, H.; Yanagida, M. Individual Variability in Human Blood Metabolites Identifies Age-Related Differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 4252–4259, doi:10.1073/pnas.1603023113.
110. Kato, Y.; Kubo, Y.; Iwata, D.; Kato, S.; Sudo, T.; Sugiura, T.; Kagaya, T.; Wakayama, T.; Hirayama, A.; Sugimoto, M.; et al. Gene Knockout and Metabolome Analysis of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1. *Pharm Res* **2010**, *27*, 832–840, doi:10.1007/s11095-010-0076-z.
111. Li, R.W.S.; Yang, C.; Sit, A.S.M.; Kwan, Y.W.; Lee, S.M.Y.; Hoi, M.P.M.; Chan, S.W.; Hausman, M.; Vanhoutte, P.M.; Leung, G.P.H. Uptake and Protective Effects of Ergothioneine in Human Endothelial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2014**, *350*, 691–700, doi:10.1124/jpet.114.214049.
112. Ishimoto, T.; Nakamichi, N.; Hosotani, H.; Masuo, Y.; Sugiura, T.; Kato, Y. Organic Cation Transporter-Mediated Ergothioneine Uptake in Mouse Neural Progenitor Cells Suppresses Proliferation and Promotes Differentiation into Neurons. *PLoS One* **2014**, *9*, e89434, doi:10.1371/journal.pone.0089434.
113. Yoneyama, M.; Kawada, K.; Gotoh, Y.; Shiba, T.; Ogita, K. Endogenous Reactive Oxygen Species Are Essential for Proliferation of Neural Stem/Progenitor Cells. *Neurochem Int* **2010**, *56*, 740–746, doi:10.1016/j.neuint.2009.11.018.
114. Cantoni, O.; Giacomoni, P. The Role of DNA Damage in the Cytotoxic Response to Hydrogen Peroxide/Histidine. *General Pharmacology: The Vascular System* **1997**, *29*, 513–516, doi:10.1016/S0306-3623(96)00363-1.
115. Liao, W.C.; Wu, W.H.; Tsai, P.-C.; Wang, H.-F.; Liu, Y.-H.; Chan, C.-F. Kinetics of Ergothioneine Inhibition of Mushroom Tyrosinase. *Appl Biochem Biotechnol* **2012**, *166*, 259–267, doi:10.1007/s12010-011-9421-x.
116. Takahashi, M.; Chin, Y.; Nonaka, T.; Hasegawa, M.; Watanabe, N.; Arai, T. Prolonged Nitric Oxide Treatment Induces Tau Aggregation in SH-SY5Y Cells. *Neurosci Lett* **2012**, *510*, 48–52, doi:10.1016/j.neulet.2011.12.067.
117. Thompson, A.; Mander, P.; Brown, G. The NO Donor DETA-NONOate Reversibly Activates an Inward Current in Neurones and Is Not Mediated by the Released Nitric Oxide. *Br J Pharmacol* **2009**, *158*, 1338–1343, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00400.x.
118. Poderoso, J.J.; Peralta, J.G.; Lisdero, C.L.; Carreras, M.C.; Radisic, M.; Schöpfer, F.; Cadenas, E.; Boveris, A. Nitric Oxide Regulates Oxygen Uptake and Hydrogen Peroxide Release by the Isolated Beating Rat Heart. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **1998**, *274*, C112–C119, doi:10.1152/ajpcell.1998.274.1.C112.
119. Poderoso, J.J.; Carreras, M.C.; Lisdero, C.; Riobó, N.; Schöpfer, F.; Boveris, A. Nitric Oxide Inhibits Electron Transfer and Increases Superoxide Radical Production in Rat Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles. *Arch Biochem Biophys* **1996**, *328*, 85–92, doi:10.1006/abbi.1996.0146.

120. Borutaite, V.; Brown, G.C. Nitric Oxide Induces Apoptosis via Hydrogen Peroxide, but Necrosis via Energy and Thiol Depletion. *Free Radic Biol Med* **2003**, *35*, 1457–1468, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.003.
121. Gokce, G.; Arun, M.Z. Ergothioneine Produces Relaxation in Isolated Rat Aorta by Inactivating Superoxide Anion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2014**, *18*, 3339–3345.
122. Martin, K.R. The Bioactive Agent Ergothioneine, a Key Component of Dietary Mushrooms, Inhibits Monocyte Binding to Endothelial Cells Characteristic of Early Cardiovascular Disease. *J Med Food* **2010**, *13*, 1340–1346, doi:10.1089/jmf.2009.0194.
123. Salama, S.A.; Abd-Allah, G.M.; Mohamadin, A.M.; Elshafey, M.M.; Gad, H.S. Ergothioneine Mitigates Cisplatin-Evoked Nephrotoxicity via Targeting Nrf2, NF- κ B, and Apoptotic Signaling and Inhibiting γ -Glutamyl Transpeptidase. *Life Sci* **2021**, *278*, 119572, doi:10.1016/j.lfs.2021.119572.
124. Salama, S.A.; Omar, H.A. Modulating NF- κ B, MAPK, and PI3K/AKT Signaling by Ergothioneine Attenuates Iron Overload-induced Hepatocellular Injury in Rats. *J Biochem Mol Toxicol* **2021**, *35*, doi:10.1002/jbt.22729.
125. Franzoni, F.; Colognato, R.; Galetta, F.; Laurenza, I.; Barsotti, M.; Di Stefano, R.; Bocchetti, R.; Regoli, F.; Carpi, A.; Balbarini, A.; et al. An in Vitro Study on the Free Radical Scavenging Capacity of Ergothioneine: Comparison with Reduced Glutathione, Uric Acid and Trolox. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2006**, *60*, 453–457, doi:10.1016/j.biopha.2006.07.015.
126. Song, T.-Y.; Lin, H.-C.; Chen, C.-L.; Wu, J.-H.; Liao, J.-W.; Hu, M.-L. Ergothioneine and Melatonin Attenuate Oxidative Stress and Protect against Learning and Memory Deficits in C57BL/6J Mice Treated with D-Galactose. *Free Radic Res* **2014**, *48*, 1049–1060, doi:10.3109/10715762.2014.920954.
127. Lei, P.; Ayton, S.; Bush, A.I.; Adlard, P.A. GSK-3 in Neurodegenerative Diseases. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, *2011*, 1–9, doi:10.4061/2011/189246.
128. Beurel, E.; Grieco, S.F.; Jope, R.S. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Regulation, Actions, and Diseases. *Pharmacol Ther* **2015**, *148*, 114–131, doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
129. Bijur, G.N.; Jope, R.S. Proapoptotic Stimuli Induce Nuclear Accumulation of Glycogen Synthase Kinase-3 β . *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 37436–37442, doi:10.1074/jbc.M105725200.
130. Beaulieu, J.-M.; Del'Guidice, T.; Sotnikova, T.D.; Lemasson, M.; Gainetdinov, R.R. Beyond CAMP: The Regulation of Akt and GSK3 by Dopamine Receptors. *Front Mol Neurosci* **2011**, *4*, doi:10.3389/fnmol.2011.00038.
131. O'Brien, W.T.; Huang, J.; Buccafusca, R.; Garskof, J.; Valvezan, A.J.; Berry, G.T.; Klein, P.S. Glycogen Synthase Kinase-3 Is Essential for β -Arrestin-2 Complex Formation and Lithium-Sensitive Behaviors in Mice. *Journal of Clinical Investigation* **2011**, *121*, 3756–3762, doi:10.1172/JCI45194.
132. Phiel, C.J.; Wilson, C.A.; Lee, V.M.-Y.; Klein, P.S. GSK-3 α Regulates Production of Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptides. *Nature* **2003**, *423*, 435–439, doi:10.1038/nature01640.
133. Himmelstein, D.S.; Ward, S.M.; Lancia, J.K.; Patterson, K.R.; Binder, L.I. Tau as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Disease. *Pharmacol Ther* **2012**, *136*, 8–22, doi:10.1016/j.pharmthera.2012.07.001.
134. Mines, M.A.; Beurel, E.; Jope, R.S. Regulation of Cell Survival Mechanisms in Alzheimer's Disease by Glycogen Synthase Kinase-3. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, *2011*, 1–11, doi:10.4061/2011/861072.

135. King, M.K.; Pardo, M.; Cheng, Y.; Downey, K.; Jope, R.S.; Beurel, E. Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitors: Rescuers of Cognitive Impairments. *Pharmacol Ther* **2014**, *141*, 1–12, doi:10.1016/j.pharmthera.2013.07.010.
136. Yao, R.; Sun, X.; Xie, Y.; Liu, L.; Han, D.; Yao, Y.; Li, H.; Li, Z.; Xu, K. Lithium Chloride Inhibits Cell Survival, Overcomes Drug Resistance, and Triggers Apoptosis in Multiple Myeloma via Activation of the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Am J Transl Res* **2018**, *10*, 2610–2618.
137. Taskaeva, I.; Gogaeva, I.; Shatruck, A.; Bgatova, N. Lithium Enhances Autophagy and Cell Death in Skin Melanoma: An Ultrastructural and Immunohistochemical Study. *Microscopy and Microanalysis* **2022**, *28*, 1703–1711, doi:10.1017/S1431927622000745.
138. Krishnan, S.; Shrestha, Y.; Jayatunga, D.P.W.; Rea, S.; Martins, R.; Bharadwaj, P. Activate or Inhibit? Implications of Autophagy Modulation as a Therapeutic Strategy for Alzheimer’s Disease. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 6739, doi:10.3390/ijms21186739.
139. Ryu, H.Y.; Kim, L.E.; Jeong, H.; Yeo, B.K.; Lee, J.-W.; Nam, H.; Ha, S.; An, H.-K.; Park, H.; Jung, S.; et al. GSK3B Induces Autophagy by Phosphorylating ULK1. *Exp Mol Med* **2021**, *53*, 369–383, doi:10.1038/s12276-021-00570-6.
140. Hanger, D.P.; Noble, W. Functional Implications of Glycogen Synthase Kinase-3-Mediated Tau Phosphorylation. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, *2011*, 1–11, doi:10.4061/2011/352805.
141. Chen, G.; Bower, K.A.; Ma, C.; Fang, S.; Thiele, C.J.; Luo, J. Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) Mediates 6- Hydroxydopamine-induced Neuronal Death. *The FASEB Journal* **2004**, *18*, 1162–1164, doi:10.1096/fj.04-1551fje.
142. Lazzara, C.A.; Kim, Y.-H. Potential Application of Lithium in Parkinson’s and Other Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* **2015**, *9*, doi:10.3389/fnins.2015.00403.
143. Iqbal, S.; Jabeen, F.; Aslam, N.; Manan, M. Anti-EMT Properties of Ergothioneine Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress-Mediated Acute Lung Injury via Modulating TGF- β /Smad/Snail Signaling Pathway. *Hum Exp Toxicol* **2023**, *42*, 096032712311780, doi:10.1177/09603271231178015.
144. Koh, S.S.; Ooi, S.C.-Y.; Lui, N.M.-Y.; Qiong, C.; Ho, L.T.-Y.; Cheah, I.K.-M.; Halliwell, B.; Herr, D.R.; Ong, W.-Y. Effect of Ergothioneine on 7-Ketocholesterol-Induced Endothelial Injury. *Neuromolecular Med* **2021**, *23*, 184–198, doi:10.1007/s12017-020-08620-4.
145. Sutherland, C. What Are the *Bona Fide* GSK3 Substrates? *Int J Alzheimers Dis* **2011**, *2011*, 1–23, doi:10.4061/2011/505607.
146. Kim, D.-H.; Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; King, J.E.; Latek, R.R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. MTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex That Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* **2002**, *110*, 163–175, doi:10.1016/S0092-8674(02)00808-5.
147. Zou, Z.; Tao, T.; Li, H.; Zhu, X. MTOR Signaling Pathway and MTOR Inhibitors in Cancer: Progress and Challenges. *Cell Biosci* **2020**, *10*, 31, doi:10.1186/s13578-020-00396-1.
148. Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M.N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **2006**, *124*, 471–484, doi:10.1016/j.cell.2006.01.016.
149. Mossmann, D.; Park, S.; Hall, M.N. MTOR Signalling and Cellular Metabolism Are Mutual Determinants in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2018**, *18*, 744–757, doi:10.1038/s41568-018-0074-8.
150. Berdenis van Berlekom, A.; Kübler, R.; Hoogeboom, J.W.; Vonk, D.; Sluijs, J.A.; Pasterkamp, R.J.; Middeldorp, J.; Kraneveld, A.D.; Garssen, J.; Kahn, R.S.; et al. Exposure to the Amino Acids Histidine, Lysine, and Threonine Reduces MTOR Activity and Affects Neurodevelopment in a Human Cerebral Organoid Model. *Nutrients* **2022**, *14*, 2175, doi:10.3390/nu14102175.

151. Meng, D.; Yang, Q.; Wang, H.; Melick, C.H.; Navlani, R.; Frank, A.R.; Jewell, J.L. Glutamine and Asparagine Activate MTORC1 Independently of Rag GTPases. *Journal of Biological Chemistry* **2020**, *295*, 2890–2899, doi:10.1074/jbc.AC119.011578.
152. Hosokawa, N.; Hara, T.; Kaizuka, T.; Kishi, C.; Takamura, A.; Miura, Y.; Iemura, S.; Natsume, T.; Takehana, K.; Yamada, N.; et al. Nutrient-Dependent MTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 1981–1991, doi:10.1091/mbc.e08-12-1248.
153. Vega-Rubin-de-Celis, S.; Peña-Llopis, S.; Konda, M.; Brugarolas, J. Multistep Regulation of TFEB by MTORC1. *Autophagy* **2017**, *13*, 464–472, doi:10.1080/15548627.2016.1271514.
154. Das, P.; Goswami, P.; Das, T.K.; Nag, T.; Sreenivas, V.; Ahuja, V.; Panda, S.K.; Gupta, S.D.; Makharia, G.K. Comparative Tight Junction Protein Expressions in Colonic Crohn’s Disease, Ulcerative Colitis, and Tuberculosis: A New Perspective. *Virchows Archiv* **2012**, *460*, 261–270, doi:10.1007/s00428-012-1195-1.
155. Lai, Y.; Xue, J.; Liu, C.-W.; Gao, B.; Chi, L.; Tu, P.; Lu, K.; Ru, H. Serum Metabolomics Identifies Altered Bioenergetics, Signaling Cascades in Parallel with Exposome Markers in Crohn’s Disease. *Molecules* **2019**, *24*, 449, doi:10.3390/molecules24030449.
156. Taubert, D.; Grimberg, G.; Jung, N.; Rubbert, A.; Schömig, E. Functional Role of the 503F Variant of the Organic Cation Transporter OCTN1 in Crohn’s Disease. *Gut* **2005**, *54*, 1505–1506, doi:10.1136/gut.2005.076083.
157. Lin, Z.; Nelson, L.; Franke, A.; Poritz, L.; Li, T.-Y.; Wu, R.; Wang, Y.; MacNeill, C.; Thomas, N.J.; Schreiber, S.; et al. OCTN1 Variant L503F Is Associated with Familial and Sporadic Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* **2010**, *4*, 132–138, doi:10.1016/j.crohns.2009.09.003.
158. Gao, Y.; Zhou, B.; Zhang, H.; Chen, L.; Wang, X.; Chen, H.; Zhou, L. Ergothioneine Exhibits Protective Effects against Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *ACS Omega* **2022**, *7*, 21554–21565, doi:10.1021/acsomega.2c01350.
159. Mikaelian, I.; Malek, M.; Gadet, R.; Viallet, J.; Garcia, A.; Girard-Gagnepain, A.; Hesling, C.; Gillet, G.; Gonzalo, P.; Rimokh, R.; et al. Genetic and Pharmacologic Inhibition of MTORC1 Promotes EMT by a TGF- β -Independent Mechanism. *Cancer Res* **2013**, *73*, 6621–6631, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0560.
160. Hernandez, S.F.; Skike, C.E. Van; DeRosa, N.; Galvan, V. MTOR Promotes BBB Breakdown in a Model of Alzheimer’s Disease. *Innov Aging* **2019**, *3*, S256–S256, doi:10.1093/geroni/igz038.957.
161. Zhang, S.; Lin, X.; Hou, Q.; Hu, Z.; Wang, Y.; Wang, Z. Regulation of MTORC1 by Amino Acids in Mammalian Cells: A General Picture of Recent Advances. *Animal Nutrition* **2021**, *7*, 1009–1023, doi:10.1016/j.aninu.2021.05.003.
162. Segev, N.; Hay, N. Hijacking Leucyl-TRNA Synthetase for Amino Acid-Dependent Regulation of TORC1. *Mol Cell* **2012**, *46*, 4–6, doi:10.1016/j.molcel.2012.03.028.
163. Shimobayashi, M.; Hall, M.N. Multiple Amino Acid Sensing Inputs to MTORC1. *Cell Res* **2016**, *26*, 7–20, doi:10.1038/cr.2015.146.
164. Song, T.-Y.; Yang, N.-C.; Chen, C.-L.; Thi, T.L.V. Protective Effects and Possible Mechanisms of Ergothioneine and Hispidin against Methylglyoxal-Induced Injuries in Rat Pheochromocytoma Cells. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 1–10, doi:10.1155/2017/4824371.
165. Dare, A.; Channa, M.L.; Nadar, A. L-Ergothioneine and Metformin Alleviates Liver Injury in Experimental Type-2 Diabetic Rats via Reduction of Oxidative Stress, Inflammation, and Hypertriglyceridemia. *Can J Physiol Pharmacol* **2021**, *99*, 1137–1147, doi:10.1139/cjpp-2021-0247.

166. Kawano, H.; Higuchi, F.; Mayumi, T.; Hama, T. Studies on Ergothioneine. VII. Some Effects of Ergothioneine on Glycolytic Metabolism in Red Blood Cells from Rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1982**, *30*, 2611–2613, doi:10.1248/cpb.30.2611.
167. Guijarro, M.V.; Indart, A.; Aruoma, O.I.; Viana, M.; Bonet, B. Effects of Ergothioneine on Diabetic Embryopathy in Pregnant Rats. *Food and Chemical Toxicology* **2002**, *40*, 1751–1755, doi:10.1016/S0278-6915(02)00177-1.
168. Mishra, A.; Reddy, I.J.; Dhali, A.; Javvaji, P.K. L-Ergothioneine Improves the Developmental Potential of *in Vitro* Sheep Embryos without Influencing OCTN1-Mediated Cross-Membrane Transcript Expression. *Zygote* **2018**, *26*, 149–161, doi:10.1017/S0967199418000047.
169. Özturkler, Y.; Yildiz, S.; Gungor, Ö.; Pancarci, Ş.M.; Kacar, C.; Ari, U.Ç. The Effects of L-Ergothioneine and L-Ascorbic Acid on the *in Vitro* Maturation (IVM) and Embryonic Development (IVC) of Sheep Oocytes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* **2009**, doi:10.9775/kvfd.2009.1646.
170. Nishigori, H.; Hayashi, R.; Lee, J.W.; Iwatsuru, M. Effect of MPG on Glucocorticoid-Induced Cataract Formation in Developing Chick Embryo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **1984**, *25*, 1051–1055.
171. D’Onofrio, N.; Servillo, L.; Giovane, A.; Casale, R.; Vitiello, M.; Marfella, R.; Paolisso, G.; Balestrieri, M.L. Ergothioneine Oxidation in the Protection against High-Glucose Induced Endothelial Senescence: Involvement of SIRT1 and SIRT6. *Free Radic Biol Med* **2016**, *96*, 211–222, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.013.
172. Cheah, I.K.; Tang, R.; Ye, P.; Yew, T.S.Z.; Lim, K.H.C.; Halliwell, B. Liver Ergothioneine Accumulation in a Guinea Pig Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. A Possible Mechanism of Defence? *Free Radic Res* **2016**, *50*, doi:10.3109/10715762.2015.1099642.
173. Deiana, M.; Rosa, A.; Casu, V.; Piga, R.; Dessi, M.; Aruoma, O. L-Ergothioneine Modulates Oxidative Damage in the Kidney and Liver of Rats *in Vivo*: Studies upon the Profile of Polyunsaturated Fatty Acids. *Clinical Nutrition* **2004**, *23*, 183–193, doi:10.1016/S0261-5614(03)00108-0.
174. Tang, Y.; Masuo, Y.; Sakai, Y.; Wakayama, T.; Sugiura, T.; Harada, R.; Futatsugi, A.; Komura, T.; Nakamichi, N.; Sekiguchi, H.; et al. Localization of Xenobiotic Transporter OCTN1/SLC22A4 in Hepatic Stellate Cells and Its Protective Role in Liver Fibrosis. *J Pharm Sci* **2016**, *105*, doi:10.1016/j.xphs.2016.02.023.
175. Gatarek, P.; Kaluzna-Czaplinska, J. Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Human Health. *EXCLI J* **2021**, *20*, 301–319, doi:10.17179/excli2020-3239.
176. Querio, G.; Antoniotti, S.; Geddo, F.; Levi, R.; Gallo, M.P. Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Impairs Purinergic Induced Intracellular Calcium Increase and Nitric Oxide Release in Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 3982, doi:10.3390/ijms23073982.
177. St. Croix, C.M.; Wasserloos, K.J.; Dineley, K.E.; Reynolds, I.J.; Levitan, E.S.; Pitt, B.R. Nitric Oxide-Induced Changes in Intracellular Zinc Homeostasis Are Mediated by Metallothionein/Thionein. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2002**, *282*, L185–L192, doi:10.1152/ajplung.00267.2001.
178. Pang, L.; Wang, T.; Liao, Q.; Cheng, Y.; Wang, D.; Li, J.; Fu, C.; Zhang, C.; Zhang, J. Protective Role of Ergothioneine Isolated from *Pleurotus Ostreatus* against Dextran Sulfate Sodium-induced Ulcerative Colitis in Rat Model. *J Food Sci* **2022**, *87*, 415–426, doi:10.1111/1750-3841.15982.
179. Huang, J.-H.; Lan, C.-C.; Hsu, Y.-T.; Tsai, C.-L.; Tzeng, I.-S.; Wang, P.; Kuo, C.-Y.; Hsieh, P.-C. Oridonin Attenuates Lipopolysaccharide-Induced ROS Accumulation and

- Inflammation in HK-2 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2020**, *2020*, 1–8, doi:10.1155/2020/9724520.
180. Xu, Y.; Huang, X.; Huangfu, B.; Hu, Y.; Xu, J.; Gao, R.; Huang, K.; He, X. Sulforaphane Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat and High-Fructose Diet via LPS/TLR4 in the Gut–Liver Axis. *Nutrients* **2023**, *15*, 743, doi:10.3390/nu15030743.
 181. D’Angelo, B.; Astarita, C.; Boffo, S.; Massaro-Giordano, M.; Antonella Ianuzzi, C.; Caporaso, A.; Macaluso, M.; Giordano, A. LPS-Induced Inflammatory Response Triggers Cell Cycle Reactivation in Murine Neuronal Cells through Retinoblastoma Proteins Induction. *Cell Cycle* **2017**, *16*, 2330–2336, doi:10.1080/15384101.2017.1363943.
 182. Jiao, H.-W.; Jia, X.-X.; Zhao, T.-J.; Rong, H.; Zhang, J.-N.; Cheng, Y.; Zhu, H.-P.; Xu, K.-L.; Guo, S.-Y.; Shi, Q.-Y.; et al. Up-Regulation of TDAG51 Is a Dependent Factor of LPS-Induced RAW264.7 Macrophages Proliferation and Cell Cycle Progression. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **2016**, *38*, 124–130, doi:10.3109/08923973.2016.1138968.
 183. Yoshida, S.; Shime, H.; Matsumoto, M.; Kasahara, M.; Seya, T. Anti-Oxidative Amino Acid L-Ergothioneine Modulates the Tumor Microenvironment to Facilitate Adjuvant Vaccine Immunotherapy. *Front Immunol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.00671.
 184. Ohri, C.M.; Shikotra, A.; Green, R.H.; Waller, D.A.; Bradding, P. The Tissue Microlocalisation and Cellular Expression of CD163, VEGF, HLA-DR, INOS, and MRP 8/14 Is Correlated to Clinical Outcome in NSCLC. *PLoS One* **2011**, *6*, e21874, doi:10.1371/journal.pone.0021874.
 185. Tacar, O.; Sriamornsak, P.; Dass, C.R. Doxorubicin: An Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2012**, *65*, 157–170, doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
 186. Fuertes, M.; Castilla, J.; Alonso, C.; Pérez, J. Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Curr Med Chem* **2003**, *10*, 257–266, doi:10.2174/0929867033368484.
 187. Iyer, V. V.; Yang, H.; Ierapetritou, M.G.; Roth, C.M. Effects of Glucose and Insulin on HepG2-C3A Cell Metabolism. *Biotechnol Bioeng* **2010**, *107*, 347–356, doi:10.1002/bit.22799.
 188. Ye, N.; Qin, J.; Liu, X.; Shi, W.; Lin, B. Characterizing Doxorubicin-Induced Apoptosis in HepG2 Cells Using an Integrated Microfluidic Device. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 1146–1153, doi:10.1002/elps.200600450.
 189. Zhang, R.; Niu, Y.; Zhou, Y. Increase the Cisplatin Cytotoxicity and Cisplatin-Induced DNA Damage in HepG2 Cells by XRCC1 Abrogation Related Mechanisms. *Toxicol Lett* **2010**, *192*, 108–114, doi:10.1016/j.toxlet.2009.10.012.
 190. Xiao, H.; Zheng, Y.; Ma, L.; Tian, L.; Sun, Q. Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. *Front Pharmacol* **2021**, *12*, doi:10.3389/fphar.2021.648407.
 191. Mirzaei, S.; Gholami, M.H.; Hashemi, F.; Zabolian, A.; Farahani, M.V.; Hushmandi, K.; Zarrabi, A.; Goldman, A.; Ashrafizadeh, M.; Orive, G. Advances in Understanding the Role of P-Gp in Doxorubicin Resistance: Molecular Pathways, Therapeutic Strategies, and Prospects. *Drug Discov Today* **2022**, *27*, 436–455, doi:10.1016/j.drudis.2021.09.020.
 192. Zhan, M.; Zhao, X.; Wang, H.; Chen, W.; Xu, S.; Wang, W.; Shen, H.; Huang, S.; Wang, J. MiR-145 Sensitizes Gallbladder Cancer to Cisplatin by Regulating Multidrug Resistance Associated Protein 1. *Tumor Biology* **2016**, *37*, 10553–10562, doi:10.1007/s13277-016-4957-6.

193. Tian, J.; Xu, Y.-Y.; Li, L.; Hao, Q. MiR-490-3p Sensitizes Ovarian Cancer Cells to Cisplatin by Directly Targeting ABCC2. *Am J Transl Res* **2017**, *9*, 1127–1138.
194. Guminski, A.D.; Balleine, R.L.; Chiew, Y.-E.; Webster, L.R.; Tapner, M.; Farrell, G.C.; Harnett, P.R.; deFazio, A. MRP2 (ABCC2) and Cisplatin Sensitivity in Hepatocytes and Human Ovarian Carcinoma. *Gynecol Oncol* **2006**, *100*, 239–246, doi:10.1016/j.ygyno.2005.08.046.
195. Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of Vincristine Resistance in P388 Leukemia in Vivo and in Vitro through Enhanced Cytotoxicity of Vincristine and Vinblastine by Verapamil. *Cancer Res* **1981**, *41*, 1967–1972.
196. Davis, W. The ATP-Binding Cassette Transporter-2 (ABCA2) Regulates Cholesterol Homeostasis and Low-Density Lipoprotein Receptor Metabolism in N2a Neuroblastoma Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2011**, *1811*, 1152–1164, doi:10.1016/j.bbalip.2011.07.010.
197. Michaki, V.; Guix, F.X.; Vennekens, K.; Munck, S.; Dingwall, C.; Davis, J.B.; Townsend, D.M.; Tew, K.D.; Feiguin, F.; De Strooper, B.; et al. Down-Regulation of the ATP-Binding Cassette Transporter 2 (Abca2) Reduces Amyloid- β Production by Altering Nicastrin Maturation and Intracellular Localization. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 1100–1111, doi:10.1074/jbc.M111.288258.
198. Davis Jr., W. The ATP-Binding Cassette Transporter-2 (ABCA2) Overexpression Modulates Sphingosine Levels and Transcription of the Amyloid Precursor Protein (APP) Gene. *Curr Alzheimer Res* **2015**, *12*, 847–859, doi:10.2174/156720501209151019105834.
199. Stride, B.D.; Grant, C.E.; Loe, D.W.; Hipfner, D.R.; Cole, S.P.C.; Deeley, R.G. Pharmacological Characterization of the Murine and Human Orthologs of Multidrug-Resistance Protein in Transfected Human Embryonic Kidney Cells. *Mol Pharmacol* **1997**, *52*, 344–353, doi:10.1124/mol.52.3.344.
200. Robbiani, D.F.; Finch, R.A.; Jäger, D.; Muller, W.A.; Sartorelli, A.C.; Randolph, G.J. The Leukotriene C4 Transporter MRP1 Regulates CCL19 (MIP-3 β , ELC)-Dependent Mobilization of Dendritic Cells to Lymph Nodes. *Cell* **2000**, *103*, 757–768, doi:10.1016/S0092-8674(00)00179-3.
201. Mitra, P.; Oskertizian, C.A.; Payne, S.G.; Beaven, M.A.; Milstien, S.; Spiegel, S. Role of ABCC1 in Export of Sphingosine-1-Phosphate from Mast Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 16394–16399, doi:10.1073/pnas.0603734103.
202. Belinsky, M.G.; Chen, Z.-S.; Shchaveleva, I.; Zeng, H.; Kruh, G.D. Characterization of the Drug Resistance and Transport Properties of Multidrug Resistance Protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* **2002**, *62*, 6172–6177.
203. Chen, Z.-S.; Guo, Y.; Belinsky, M.G.; Kotova, E.; Kruh, G.D. Transport of Bile Acids, Sulfated Steroids, Estradiol 17- β -d-Glucuronide, and Leukotriene C4 by Human Multidrug Resistance Protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* **2005**, *67*, 545–557, doi:10.1124/mol.104.007138.
204. Guo, Y.; Kotova, E.; Chen, Z.-S.; Lee, K.; Hopper-Borge, E.; Belinsky, M.G.; Kruh, G.D. MRP8, ATP-Binding Cassette C11 (ABCC11), Is a Cyclic Nucleotide Efflux Pump and a Resistance Factor for Fluoropyrimidines 2',3'-Dideoxycytidine and 9'-(2'-Phosphonylmethoxyethyl)Adenine. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 29509–29514, doi:10.1074/jbc.M304059200.
205. Chen, Z.-S.; Guo, Y.; Belinsky, M.G.; Kotova, E.; Kruh, G.D. Transport of Bile Acids, Sulfated Steroids, Estradiol 17- β -d-Glucuronide, and Leukotriene C4 by Human Multidrug Resistance Protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* **2005**, *67*, 545–557, doi:10.1124/mol.104.007138.

206. Fukuda, Y.; Cheong, P.L.; Lynch, J.; Brighton, C.; Frase, S.; Kargas, V.; Rampersaud, E.; Wang, Y.; Sankaran, V.G.; Yu, B.; et al. The Severity of Hereditary Porphyria Is Modulated by the Porphyrin Exporter and Lan Antigen ABCB6. *Nat Commun* **2016**, *7*, 12353, doi:10.1038/ncomms12353.
207. Kiss, K.; Brozik, A.; Kucsma, N.; Toth, A.; Gera, M.; Berry, L.; Vallentin, A.; Vial, H.; Vidal, M.; Szakacs, G. Shifting the Paradigm: The Putative Mitochondrial Protein ABCB6 Resides in the Lysosomes of Cells and in the Plasma Membrane of Erythrocytes. *PLoS One* **2012**, *7*, e37378, doi:10.1371/journal.pone.0037378.
208. Mitsuhashi, N.; Miki, T.; Senbongi, H.; Yokoi, N.; Yano, H.; Miyazaki, M.; Nakajima, N.; Iwanaga, T.; Yokoyama, Y.; Shibata, T.; et al. MTABC3, a Novel Mitochondrial ATP-Binding Cassette Protein Involved in Iron Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 17536–17540, doi:10.1074/jbc.275.23.17536.
209. Rakvács, Z.; Kucsma, N.; Gera, M.; Igriczi, B.; Kiss, K.; Barna, J.; Kovács, D.; Vellai, T.; Benes, L.; Reisecker, J.M.; et al. The Human ABCB6 Protein Is the Functional Homologue of HMT-1 Proteins Mediating Cadmium Detoxification. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2019**, *76*, 4131–4144, doi:10.1007/s00018-019-03105-5.
210. Chavan, H.; Oruganti, M.; Krishnamurthy, P. The ATP-Binding Cassette Transporter ABCB6 Is Induced by Arsenic and Protects against Arsenic Cytotoxicity. *Toxicological Sciences* **2011**, *120*, 519–528, doi:10.1093/toxsci/kfr008.
211. Minami, K.; Kamijo, Y.; Nishizawa, Y.; Tabata, S.; Horikuchi, F.; Yamamoto, M.; Kawahara, K.; Shinsato, Y.; Tachiwada, T.; Chen, Z.-S.; et al. Expression of ABCB6 Is Related to Resistance to 5-FU, SN-38 and Vincristine. *Anticancer Res* **2014**, *34*, 4767–4773.
212. Jedlitschky, G.; Burchell, B.; Keppler, D. The Multidrug Resistance Protein 5 Functions as an ATP-Dependent Export Pump for Cyclic Nucleotides. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 30069–30074, doi:10.1074/jbc.M005463200.
213. Reid, G.; Wielinga, P.; Zelcer, N.; de Haas, M.; van Deemter, L.; Wijnholds, J.; Balzarini, J.; Borst, P. Characterization of the Transport of Nucleoside Analog Drugs by the Human Multidrug Resistance Proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol* **2003**, *63*, 1094–1103, doi:10.1124/mol.63.5.1094.
214. Wijnholds, J.; Mol, C.A.A.M.; van Deemter, L.; de Haas, M.; Scheffer, G.L.; Baas, F.; Beijnen, J.H.; Scheper, R.J.; Hatse, S.; De Clercq, E.; et al. Multidrug-Resistance Protein 5 Is a Multispecific Organic Anion Transporter Able to Transport Nucleotide Analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 7476–7481, doi:10.1073/pnas.120159197.
215. Korolnek, T.; Zhang, J.; Beardsley, S.; Scheffer, G.L.; Hamza, I. Control of Metazoan Heme Homeostasis by a Conserved Multidrug Resistance Protein. *Cell Metab* **2014**, *19*, 1008–1019, doi:10.1016/j.cmet.2014.03.030.
216. Peterson, E.; Shippee, E.; Brinton, M.A.; Kaur, P. Biochemical Characterization of the Mouse ABCF3 Protein, a Partner of the Flavivirus-Resistance Protein OAS1B. *Journal of Biological Chemistry* **2019**, *294*, 14937–14952, doi:10.1074/jbc.RA119.008477.
217. Ahlin, G.; Hilgendorf, C.; Karlsson, J.; Szigyarto, C.A.-K.; Uhlén, M.; Artursson, P. Endogenous Gene and Protein Expression of Drug-Transporting Proteins in Cell Lines Routinely Used in Drug Discovery Programs. *Drug Metabolism and Disposition* **2009**, *37*, 2275–2283, doi:10.1124/dmd.109.028654.
218. Watts, R.N.; Ponka, P.; Richardson, D.R. Effects of Nitrogen Monoxide and Carbon Monoxide on Molecular and Cellular Iron Metabolism: Mirror-Image Effector Molecules That Target Iron. *Biochemical Journal* **2003**, *369*, 429–440, doi:10.1042/bj20021302.

219. Russell, T.M.; Azad, M.G.; Richardson, D.R. The Relationship of Glutathione-S-Transferase and Multi-Drug Resistance-Related Protein 1 in Nitric Oxide (NO) Transport and Storage. *Molecules* **2021**, *26*, 5784, doi:10.3390/molecules26195784.
220. Toledo, J.C.; Bosworth, C.A.; Hennon, S.W.; Mahtani, H.A.; Bergonia, H.A.; Lancaster, J.R. Nitric Oxide-Induced Conversion of Cellular Chelatable Iron into Macromolecule-Bound Paramagnetic Dinitrosyliron Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 28926–28933, doi:10.1074/jbc.M707862200.
221. Suryo Rahmanto, Y.; Kalinowski, D.S.; Lane, D.J.R.; Lok, H.C.; Richardson, V.; Richardson, D.R. Nitrogen Monoxide (NO) Storage and Transport by Dinitrosyl-Dithiol-Iron Complexes: Long-Lived NO That Is Trafficked by Interacting Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 6960–6968, doi:10.1074/jbc.R111.329847.
222. Hickok, J.R.; Sahni, S.; Shen, H.; Arvind, A.; Antoniou, C.; Fung, L.W.M.; Thomas, D.D. Dinitrosyliron Complexes Are the Most Abundant Nitric Oxide-Derived Cellular Adduct: Biological Parameters of Assembly and Disappearance. *Free Radic Biol Med* **2011**, *51*, 1558–1566, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.030.
223. Shumaev, K.B.; Gubkin, A.A.; Serezhenkov, V.A.; Lobysheva, I.I.; Kosmachevskaya, O. V.; Ruuge, E.K.; Lankin, V.Z.; Topunov, A.F.; Vanin, A.F. Interaction of Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Albumin- and Methemoglobin-Bound Dinitrosyl-Iron Complexes. *Nitric Oxide* **2008**, *18*, 37–46, doi:10.1016/j.niox.2007.09.085.
224. Watts, R.N.; Richardson, D.R. Nitrogen Monoxide (NO) and Glucose. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 4724–4732, doi:10.1074/jbc.M006318200.
225. Lok, H.C.; Rahmanto, Y.S.; Hawkins, C.L.; Kalinowski, D.S.; Morrow, C.S.; Townsend, A.J.; Ponka, P.; Richardson, D.R. Nitric Oxide Storage and Transport in Cells Are Mediated by Glutathione S-Transferase P1-1 and Multidrug Resistance Protein 1 via Dinitrosyl Iron Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 607–618, doi:10.1074/jbc.M111.310987.
226. Lok, H.C.; Sahni, S.; Jansson, P.J.; Kovacevic, Z.; Hawkins, C.L.; Richardson, D.R. A Nitric Oxide Storage and Transport System That Protects Activated Macrophages from Endogenous Nitric Oxide Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291*, 27042–27061, doi:10.1074/jbc.M116.763714.
227. Watts, R.N.; Hawkins, C.; Ponka, P.; Richardson, D.R. Nitrogen Monoxide (NO)-Mediated Iron Release from Cells Is Linked to NO-Induced Glutathione Efflux via Multidrug Resistance-Associated Protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 7670–7675, doi:10.1073/pnas.0602515103.
228. Denninger, J.W.; Marletta, M.A. Guanylate Cyclase and the ·NO/CGMP Signaling Pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1999**, *1411*, 334–350, doi:10.1016/S0005-2728(99)00024-9.
229. Pedersen, J.Z.; De Maria, F.; Turella, P.; Federici, G.; Mattei, M.; Fabrini, R.; Dawood, K.F.; Massimi, M.; Caccuri, A.M.; Ricci, G. Glutathione Transferases Sequester Toxic Dinitrosyl-Iron Complexes in Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 6364–6371, doi:10.1074/jbc.M609905200.
230. Richardson, D.R.; Neumannova, V.; Ponka, P. Nitrogen Monoxide Decreases Iron Uptake from Transferrin but Does Not Mobilise Iron from Prelabelled Neoplastic Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1995**, *1266*, 250–260, doi:10.1016/0167-4889(95)00022-K.
231. Asano, T.; Komatsu, M.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Ishikawa, F.; Mizushima, N.; Iwai, K. Distinct Mechanisms of Ferritin Delivery to Lysosomes in Iron-Depleted and Iron-Replete Cells. *Mol Cell Biol* **2011**, *31*, 2040–2052, doi:10.1128/MCB.01437-10.

232. Lewandowska, H.; Męczyńska, S.; Sochanowicz, B.; Sadło, J.; Kruszewski, M. Crucial Role of Lysosomal Iron in the Formation of Dinitrosyl Iron Complexes in Vivo. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, *12*, 345–352, doi:10.1007/s00775-006-0192-8.