



UMCS

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

**UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
W Lublinie**

Wydział Biologii i Biotechnologii

Kierunek: **Biotechnologia**

Przemysław Sołek

**Wykorzystanie komórkowego modelu do
badań *in vitro* mechanizmów toksyczności
leków przeciwdepresyjnych o różnym
profilu działań niepożądanych**

The application of a cellular model for in vitro studies of antidepressants-induced toxicity mechanisms with different profiles of adverse reactions

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana w Katedrze Fizjologii i Rozrodu Zwierząt Uniwersytetu
Rzeszowskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Marka
Koziorowskiego oraz dr n. med. Magdaleny Sowy-Kućmy

LUBLIN 2019

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania dla Promotora, Prof. dr hab. Marka Koziorowskiego za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej, cierpliwość i wyrozumiałość oraz motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą. Szczególne dziękuję za pomoc w jasnym formułowaniu myśli naukowej oraz inspirację do kreatywnego poszukiwania rozwiązań problemów badawczych.

Pragnę również złożyć serdeczne podziękowania dla Promotora pomocniczego, dr n. med. Magdaleny Sowy-Kućmy bez której moja praca doktorska nie mogłaby powstać. Dziękuję za inspirację do badań, pomoc w planowaniu doświadczeń w ramach projektu Preludium, cenne uwagi merytoryczne oraz sugestie, poświęcony czas jak również wsparcie okazywane przez cały okres naszej współpracy.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam koleżankom i kolegom z Katedry Fizjologii i Rozrodu Zwierząt Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego za przekazaną wiedzę, pomoc w zakresie technik eksperymentalnych oraz prawdziwie naukową atmosferę w pracy.



Praca została zrealizowana w ramach grantu badawczego przyznanego na podstawie decyzji numer UMO-2014/15/N/NZ7/04097 zatytułowanego "Ocena toksyczności wybranych leków przeciwdepresyjnych na podstawie badań in vitro spermatocytów szczura oraz mysich linii komórkowych" w ramach konkursu "PRELUDIUM" ogłoszonego przez Narodowe Centrum Nauki.

Spis treści

Streszczenie	7
<i>Abstract</i>	9
Wykaz skrótów	11
1. Wstęp	14
1.1. Depresja – wprowadzenie	14
1.2. Leki przeciwdepresyjne: definicja, podział, mechanizm działania.....	16
1.3. Skutki uboczne leków przeciwdepresyjnych	17
1.3.1. Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TCAs).....	19
1.3.2. Inhibitory monoaminooksydazy (MAOIs).....	19
1.3.3. Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRIs)	20
1.3.4. Inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRIs)	21
2. Cel pracy i hipoteza badawcza	23
3. Materiały i metody	24
3.1. Materiał doświadczalny.....	24
3.2. Metody.....	27
3.2.1. Hodowla <i>in vitro</i> linii komórkowych GC-1 spg oraz GC-2 spd.....	27
3.2.2. Przygotowanie roztworów leków	28
3.2.3. Ocena aktywności metabolicznej komórek – test MTT	29
3.2.4. Oznaczenie równowagi redoks (RFT, RFA, redukcja glutationu).....	30
3.2.5. Ocena zmian morfologicznych	31
3.2.6. Analiza przemian energetycznych komórek.....	31
3.2.7. Analiza profilu cyklu komórkowego	32
3.2.8. Detekcja uszkodzeń – powstawanie mikrojąder (MN).....	33
3.2.9. Izolacja całkowitego RNA.....	33

3.2.10. Ilościowa i jakościowa ocena preparatów RNA	34
3.2.11. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA (Real – Time PCR).....	35
<i>Synteza cDNA oraz amplifikacja z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym</i>	35
3.2.12. Analiza poziomu syntezy białek (technika Western Blot)	36
<i>Izolacja lizatów białkowych z hodowli oraz oznaczenie stężenia białek metodą BCA</i>	36
<i>Identyfikacja białek z wykorzystaniem techniki Western Blot</i>	38
3.2.13. Analiza uszkodzeń DNA metodą TUNEL	41
3.2.14. Ocena żywotności komórek za pomocą barwienia bromek etydyny/oranż akrydyny (EtBr/OA)	42
3.2.15. Ocena żywotności za pomocą zestawu Fluo Cell Double Staining Kit Calcein AM/PI	43
3.2.16. Lokalizacja receptora alfa-2-adrenergicznego oraz transportera serotoniny metodą immunohistochemiczną oraz immunofluorescencyjną.....	43
<i>Metoda immunohistochemiczna oznaczania receptorów w tkankach jąder</i>	44
<i>Barwienie hematoksylina/eozyną (HE) tkanek jąder</i>	46
<i>Metoda immunofluorescencyjna oznaczania receptorów w liniach komórkowych</i>	46
3.2.17. Analiza statystyczna i opracowanie wyników	47
4. Wyniki	48
4.1. Lokalizacja receptorów alfa-2-adrenergicznych oraz transporterów białkowych serotoniny w preparatach histologicznych jąder szczura oraz komórkach spermatocytów badanych linii komórkowych <i>in vitro</i>	48
4.2. Wybór stężeń leków przeciwdepresyjnych do dalszych badań.....	51
4.3. Ocena profilu generowanych reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) oraz stopnia redukcji glutationu	60
4.4. Morfologiczna ocena komórek.....	74
4.5. Ocena przemian energetycznych w komórkach	79

4.6. Analiza profilu cyklu komórkowego.....	82
4.7. Ocena uszkodzeń materiału genetycznego komórek	85
4.8. Zmiany w ekspresji genów odgrywających kluczową rolę w podziale mejotycznym.....	91
4.8. Analiza ścieżek sygnalizacyjnych wewnątrzkomórkowej.....	97
4.8. Ocena fragmentacji DNA komórkowego.....	111
4.8. Ocena śmierci komórkowej za pomocą barwienia różnicowego	116
5. Dyskusja	126
6. Wnioski	141
7. Piśmiennictwo	142

Streszczenie

Według Światowej Organizacji Zdrowia depresja stanowi jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób na świecie. Współczesna psychiatria jako definicję depresji podaje, że jest to wieloczynnikowe zaburzenie psychiczne zaliczane do grupy chorób afektywnych. Najczęstszą formą leczenia jest farmako- i psychoterapia. Większość autorów zgadza się, że upośledzenie funkcji seksualnych jest możliwym skutkiem ubocznym leczenia farmakologicznego, odnotowanym praktycznie wśród każdej grupy leków przeciwdepresyjnych. Wykazano, że ich toksyczność na komórki rozrodcze ma fundamentalne znaczenie ze względu na możliwość zmian genetycznych komórek przyszłych pokoleń. Dlatego, toksyczność leków przeciwdepresyjnych staje się ważnym zagadnieniem w kontekście skuteczności leczenia.

Postawiona w niniejszej pracy doktorskiej hipoteza badawcza zakładała, że leki przeciwdepresyjne działają toksycznie względem komórek rozrodczych, co może stanowić bezpośrednią przyczynę obniżonej męskiej płodności osobniczej. Z tego powodu, zasadniczym celem naukowym prowadzonych badań była wieloczynnikowa ocena potencjalnej toksyczności leków przeciwdepresyjnych (amitryptyliny, escitalopramu, fluoksetyny, imipraminy, mirtazapiny, olanzapiny, reboksetyny, wenlafaksyny) na komórki szlaku spermatogenezy (linie komórkowe GC-1 spg i GC-2 spd) pod względem cech komórkowych, molekularnych i biochemicznych *in vitro*.

Uzyskane wyniki sugerują cytotoksyczne właściwości leków bezpośrednio zależne od stężenia substancji oraz czasu ekspozycji, zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej, niewydolność enzymatycznych oraz nieenzymatycznych mechanizmów ochrony komórki, upośledzenie funkcji mitochondriów i spadek produkcji ATP, zatrzymanie cyklu komórkowego związane z aktywacją białek p21 i p53 oraz ścieżki zależnej od p16, genotoksyczne właściwości charakteryzujące się uszkodzeniem DNA i nadprodukcją mikrojąder. Ponadto, odnotowano uruchomienie wewnątrzkomórkowych mechanizmów adaptacyjnych zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA, zabezpieczających telomerowe odcinki chromosomów oraz stabilizujących wrzeciono kariokinetyczne.

Wykorzystane techniki umożliwiły częściowe zrozumienie patomechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych i związanej z nimi reprotoksyczności względem komórek męskiego układu rozrodczego. Niewątpliwie opracowanie nowych podejść terapeutycznych ukierunkowanych na zwiększenie skuteczności lub tolerancji już istniejących leków jest bardzo istotne. Cel ten można zrealizować poprzez rozwój produktów leczniczych przy pomocy narzędzi biotechnologii, a z punktu widzenia klinicznego, ważne jest zaproponowanie odpowiedzi na pytanie, który z leków przeciwdepresyjnych ma bardziej korzystny profil działań niepożądanych w stosunku do komórek męskiego układu rozrodczego

Abstract

According to the World Health Organization, depression is one of the most widespread diseases in the world. Contemporary psychiatry as a definition of depression states that it is a multifactorial mental disorder classified within the group of affective disorders. The most common form of its treatment is pharmacotherapy and psychotherapy. Most authors agree that sexual dysfunctions are a possible side effects of pharmacological treatment, recorded in every group of antidepressants applied in current treatment. It has been shown that their toxicity to reproductive cells is fundamental due to the possibility of genetic changes in the cells of future generations. Therefore, the toxicity of antidepressants becomes an important issue in the context of treatment efficacy.

The research hypothesis presented in this dissertation assumed that antidepressants are toxic to reproductive cells, which may be a direct cause of decreased male fertility. For this reason, the main scientific goal of the conducted research was the multilevel evaluation of the potential toxicity of antidepressants (amitriptyline, escitalopram, fluoxetine, imipramine, mirtazapine, olanzapine, reboxetine, venlafaxine) on the cells of the spermatogenesis pathway (GC-1 spg and GC-2 spd) in cellular, molecular and biochemical features *in vitro*.

Obtained results suggest cytotoxic properties of drugs directly related to the drug concentration and exposure time, disturbances in redox balance, failure of enzymatic and non-enzymatic cell protection mechanisms, impairment of mitochondrial functions and decrease in ATP production, cell cycle arrest associated with activation of p21 and p53 proteins and p16-dependent pathway, genotoxic properties characterized by DNA damage and overproduction of micronuclei. In addition, the initiation of intracellular adaptation mechanisms involved in the repair of DNA damage, protecting telomere fragments of chromosomes and stabilizing kariokinetic spindles were noted.

The techniques used in this study have made it possible to partially understand the pathomechanisms of the action of antidepressants and their

associated reprotoxicity towards cells of the male reproductive system. Undoubtedly, the development of new therapeutic approaches aimed at increasing the effectiveness or tolerance of existing drugs is very important. This goal can be achieved through the development of medicinal products using biotechnology tools, and from a clinical point of view, it is important to propose an answer to the question of which of the antidepressants has a more favorable profile of side effects in relation to the cells of the male reproductive system.

Wykaz skrótów

A549	linia komórkowa gruczolakoraka płuc (ang. <i>lung adenocarcinoma</i>)
ADR	działania niepożądane leków (ang. <i>adverse drug reaction</i>)
alfa-2a	receptor alfa-2-adrenergiczny (ang. <i>alpha-2 adrenergic receptor</i>)
AMI	amitryptylina (ang. <i>amitriptyline</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>)
BCA	kwas bicinchoninowy (ang. <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	albumina surowicy bydłowej (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
C6	szczurza linia komórek glejaka (ang. <i>rattus norvegicus brain glioma</i>)
CDK	kinazy cyklinozależne (ang. <i>cyclin-dependent kinase</i>)
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
DAF-FM	4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceina (ang. <i>4-Amino-5-methylamino2',7'-difluorofluorescein</i>)
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol (ang. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DHE	dihydroetydyna (ang. <i>dihydroethidium</i>)
DMEM	medium do hodowli komórek (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	sulfotlenek dimetylu (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>).
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPBS	bufor DPBS (ang. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
DSM5	system klasyfikacji zaburzeń psychicznych (ang. <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>)
EDTA	wersenian disodu (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
Egr-1	czynnik transkrypcyjny Egr-1 (ang. <i>early growth response protein 1</i>)
ER	siateczka śródplazmatyczna (ang. <i>endoplasmic reticulum</i>)
ERK	kinazy aktywowane miogenami (ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
ESC	escitalopram (ang. <i>escitalopram</i>)
FBS	plodowa surowica bydła (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FGF2	czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor 2</i>)
FITC	izotiocyanian fluoresceiny (ang. <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FLU	fluoksetyna (ang. <i>fluoxetine</i>)

GBM8401	linia komórek glejaka wielopostaciowego (ang. <i>cellosaurus cell line</i>)
GC-1 spg	linia spermatogonii typu B (ang. <i>spermatogonia cell line</i>)
GC-2 spd	linia spermatocytów (ang. <i>spermatocyte cell line</i>)
GR	receptor glukokortykoidowy (ang. <i>glucocorticoid receptor</i>)
H460	linia komórek nowotworowych płuc (ang. <i>non-small-cell lung cancer cell line</i>)
HCC	linia komórek raka wątrobowo-komórkowego (ang. <i>human hepatocellular carcinoma cell line</i>)
HE	hematoksylina/eozyna (ang. <i>hematoxylin /eosin</i>)
Hep3B	linia komórek raka wątrobowo komórkowego (ang. <i>hepatocellular carcinoma cell line</i>)
hMSC	ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste (ang. <i>human mesenchymal stem cells</i>)
Hs683	linia komórek glejaka (ang. <i>brain glioma cell line</i>)
HT-22	linia mysich komórek hipokampa (ang. <i>mouse hippocampal neuronal cell line</i>)
ICD-10	międzynarodowy system diagnozy nozologicznej (ang. <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>)
IMI	imipramina (ang. <i>imipramine</i>)
LPD	leki przeciwdepresyjne, antydepresanty, tymoleptyki
MAOIs	inhibitory monoaminooksydazy (ang. <i>monoamine oxidase inhibitors</i>)
MAPK	kinazy aktywowane mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MCF-7	linia komórek ludzkiego raka piersi (ang. <i>human breast adenocarcinoma cell line</i>)
MDD	duże epizody depresyjne (ang. <i>major depressive disorder</i>)
MIR	mirtazapina (ang. <i>mirtazapine</i>)
MN	mikrojądra (ang. <i>micronuclei</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu (ang. <i>thiazolyl blue tetrazolium bromide</i>)
NF-κB	czynnik transkrypcyjny NF-κB (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NuMa	białko składowe centrosomu (ang. <i>nuclear mitotic apparatus protein</i>)
OLZ	olanzapina (ang. <i>olanzapine</i>)

PBS	bufor PBS (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC12	linia komórek wyprowadzona z guza chromochłonnego nadnerczy szczura (ang. <i>rattus norvegicus adrenal gland pheochromocytoma</i>)
REB	reboksetyna (ang. <i>reboxetine</i>)
RFA	reaktywne formy azotu (ang. <i>reactive nitrogen species</i>)
RFT	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
RFU	jednostka względnej fluorescencji (ang. <i>relative fluorescence unit</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RT	temperatura pokojowa (ang. <i>room temperature</i>)
SCP1	białko kompleksu synaptonemalnego 1 (ang. <i>synaptonemal complex protein 1</i>)
SCP3	białko kompleksu synaptonemalnego 3 (ang. <i>synaptonemal complex protein 3</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SDS	laurylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	elektroforeza w warunkach SDS-PAGE (ang. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SERT	transporter serotoniny (ang. <i>serotonin transporter</i>)
SK-Hep1	linia komórek raka wątrobowo-komórkowego (ang. <i>hepatic adenocarcinoma cell line</i>)
SNRIs	inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (ang. <i>serotonin norepinephrine reuptake inhibitor</i>)
SSRIs	selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (ang. <i>selective serotonin reuptake inhibitors</i>)
TCA	trójcykliczne leki przeciwdepresyjne, leki trójpierścieniowe (ang. <i>tricyclic antidepressants</i>)
TEMED	N'-tetrametyloetylenodiamina (ang. <i>tetramethylethylenediamine</i>)
TRF1	białko kompleksu telomerowego 1 (ang. <i>telomeric repeat-binding factor 1</i>)
TRF2	białko kompleksu telomerowego 2 (ang. <i>telomeric repeat-binding factor 2</i>)
U-87 MG	linia komórek glejaka wielopostaciowego (ang. <i>glioblastoma cell line</i>)
VEN	wenlafaksyna (ang. <i>venlafaxine</i>)

1. Wstęp

1.1. Depresja – wprowadzenie

Według Amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia Psychicznego zaburzenia nastroju, a wśród nich duże epizody depresyjne (ang. MDD – *major depressive disorder*) są znaczącym problemem zdrowotnym o zasięgu globalnym. Dane piśmiennictwa sugerują, że blisko 20 % kobiet oraz 12 % mężczyzn jest leczonych z ich powodu [1-4]. Zrozumienie natury oraz przyczyn zaburzeń depresyjnych stanowiło przedmiot licznych dyskusji i intensywnych badań ostatniego wieku [4, 5]. Do dziś w światowym piśmiennictwie można odnaleźć wiele sprzecznych informacji co do samej etiologii depresji jak i jej objawów. Niemniej, naukowcy zgodnie twierdzą: depresja destruktywnie wpływa na jakość życia codziennego i wydajność pracy przez co chorzy często czują się wyobcowani w swoim środowisku [6].

Depresja zaliczana jest do grupy chorób afektywnych, w których okresowo występują zaburzenia nastroju, emocji i aktywności psychoruchowej. Najczęściej pacjenci uskarżają się na brak energii i motywacji do działania oraz utratę zdolności do odczuwania przyjemności [7, 8]. Skuteczne rozpoznanie oraz leczenie zaburzeń depresyjnych jest stosunkowo trudne. Nie ma dokładnych badań laboratoryjnych wykorzystywanych w diagnostyce depresji. Najprawdopodobniej dlatego, że depresja jest chorobą wieloczynnikową, wywoływaną przez połączenie i często akumulację zaburzeń systemów biologicznych, genetycznych, ekologicznych oraz psychologicznych (Fig. 1.1.) [9]. W praktyce, rozpoznanie opiera się na badaniu stanu zdrowia psychicznego w oparciu o kryteria zawarte w aktualnych systemach klasyfikacyjnych. Są to: międzynarodowy system diagnozy nozologicznej ICD-10 (ang. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) opracowany przez Światową Organizację Zdrowia oraz system klasyfikacji zaburzeń psychicznych DSM5 (ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) opracowany przez Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne. W oparciu

o zdobyte informacje w trakcie wywiadu lekarskiego, farmakoterapia osób z zaawansowaną depresją może charakteryzować się dużą skutecznością [10, 11].

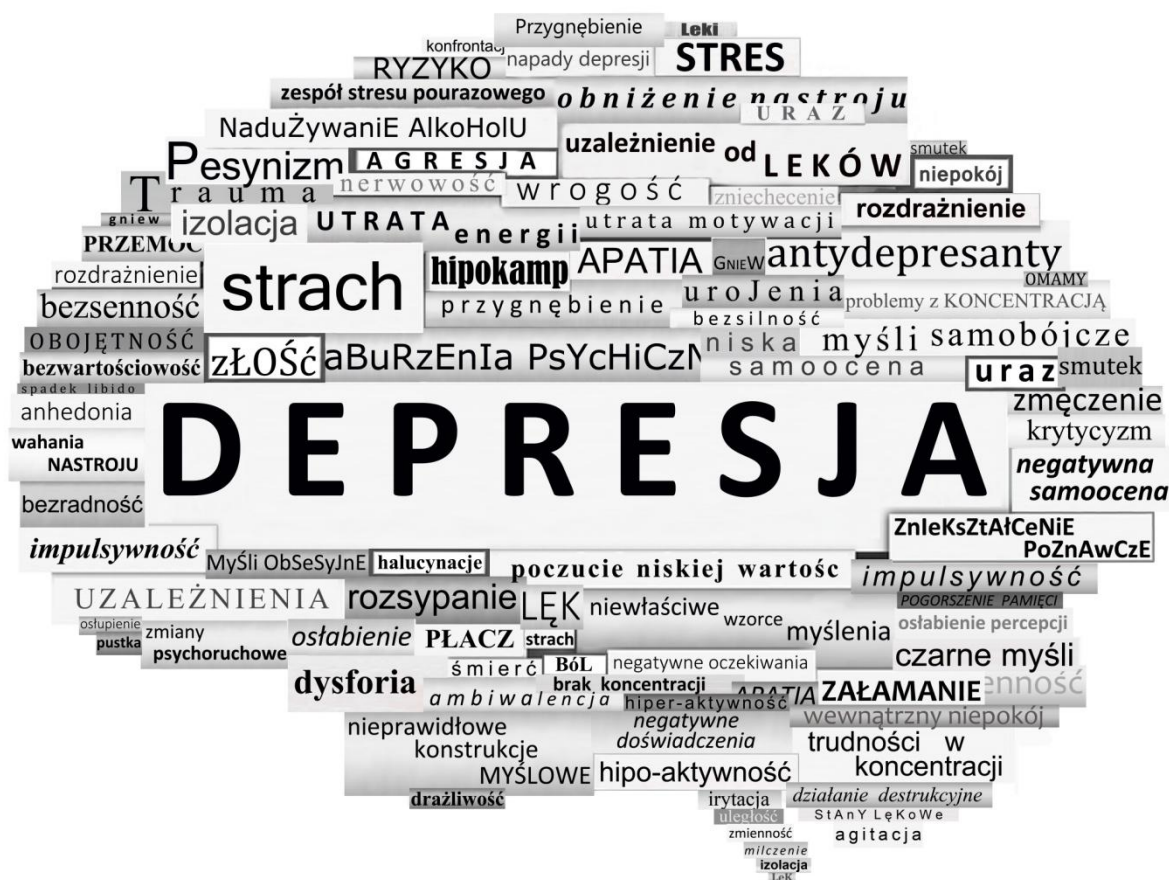


Fig. 1.1. Objawy psychiczne oraz somatyczne zaburzeń depresyjnych (opracowanie własne).

Depresja to nie tylko problem medyczny oraz społeczny ale również ekonomiczny. Zaliczana jest do chorób o zasięgu globalnym, niezależnie od płci, wieku, rasy oraz statusu społecznego. Dotychczasowe metody leczenia są niewystarczające [12, 13]. Nawracające epizody depresyjne generują wzrost kosztów leczenia. Szacuje się, że u około 40 % zdiagnozowanych pacjentów odnotowano nawrót choroby w ciągu 6 miesięcy po zakończeniu leczenia farmakologicznego [1]. Stąd, identyfikacja nowych czynników ryzyka oraz biomarkerów choroby stanowi jedno z największych wyzwań dla światowego zdrowia psychicznego [14].

1.2. Leki przeciwdepresyjne: definicja, podział, mechanizm działania.

W chwili obecnej leczenie zaburzeń depresyjnych opiera się głównie na stosowaniu indywidualnie dobranych leków przeciwdepresyjnych, jak również w wielu przypadkach psychoterapii. Wykorzystywane antydepresanty, tymoleptyki (LPD) stanowią niejednorodną grupę leków pod względem budowy chemicznej i mechanizmów działania. Zasadniczo są to substancje chemiczne stosowane głównie w leczeniu zaburzeń nastroju. Poza leczeniem depresji leki te są czasami stosowane w opanowaniu niektórych uzależnień, leczeniu stanów lękowych, przewlekłego bólu, zaburzeń snu i niektórych innych zaburzeń, nie zawsze związanych bezpośrednio z depresją. Co więcej, leki przeciwdepresyjne są często stosowane w połączeniu ze sobą, w formie terapii skojarzonej [5, 15, 16].

Farmakoterapia zaburzeń depresyjnych może obejmować leki przeciwdepresyjne pierwszej generacji (trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne i inhibitory oksydazy monoaminowej) oraz stosunkowo niedawno opracowane leki przeciwdepresyjne drugiej generacji (selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny-SSRI oraz inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i norepinefryny-SNRI). Każda z pięciu głównych grup leków przeciwdepresyjnych charakteryzuje się różnym profilem korzyści, ryzyka i odpowiedniego zastosowania. Niektóre leki mogą być uważane za preferowane, jednakże ostateczny wybór leku zależy od objawów, historii leczenia i współistniejących zaburzeń psychicznych [16, 17].

Mechanizm działania większości z tych środków jest słabo poznany. Leki poprawiają nastrój pacjentów i działają, przynajmniej częściowo, poprzez zmianę poziomu substancji chemicznych w mózgu (neuroprzekaźników), takich jak serotonina, noradrenalina lub dopamina w ośrodkowym układzie nerwowym. To właśnie niektóre neuroprzekaźniki, jak serotonina i noradrenalina, są powiązane z nastrojem i emocjami. Neuroprzekaźniki wpływają również na sygnały bólowe wysyłane przez nerwy, co może wyjaśniać, dlaczego niektóre leki przeciwdepresyjne są stosowane niezgodnie z przeznaczeniem i mogą pomóc łagodzić długotrwały ból [17].

Leki przeciwdepresyjne zostały podzielone w zależności od tego, jak wpływają na funkcję mózgu. Podczas gdy leki przeciwdepresyjne w obrębie jednej grupy mają podobne skutki uboczne i mechanizmy działania to istnieją zasadnicze różnice w ich

strukturach, które mogą wpływać między innymi na to, jak dobrze lek jest tolerowany u różnych ludzi.

1.3. Skutki uboczne leków przeciwdepresyjnych

Skuteczność antydepresantów pierwszej i drugiej generacji jest podobna [18]. Leki wykazują opóźniony efekt terapeutyczny. Oznacza to, iż pierwsze oznaki poprawy pojawiają się po 10 - 14 dniach stosowania leku, natomiast pełny efekt terapeutyczny obserwowany jest po około 4 tygodniach u większości pacjentów [4, 19-21]. Wiadomo, że oprócz wpływu na centralny układ nerwowy (głównie mózg) antydepresanty mogą wywierać wiele efektów ubocznych na tkanki obwodowe. Efektami ubocznymi leczenia farmakologicznego są tzw. działania niepożądane leków (ang. ADR – *adverse drug reaction*), potocznie efekty uboczne lub skutki uboczne [5]. Z podstawowej definicji są to wszelkie szkodliwe lub niepożądane reakcje, wynikające ze stosowania produktu leczniczego [22]. Stosowanie konkretnego leku przeciwdepresyjnego w określonym przypadku klinicznym zależy bezpośrednio od profilu farmakologicznego leku i może być związane z odmiennym stopniem zaburzeń [4]. Do najczęściej występujących objawów ubocznych towarzyszących stosowaniu LPD należą efekty cholinolityczne, np.: wysychanie błon śluzowych jamy ustnej i dróg oddechowych, zaburzenia ostrości widzenia oraz efekty adrenergiczne takie jak zaburzenia akcji serca. Na poziomie komórkowym, odnotowano między innymi działanie genotoksyczne, zaburzenia w procesie mitozy i mejozy a także aberracje chromosomowe oraz uszkodzenia DNA [6, 8, 19, 23, 24].

Działania niepożądane leków mogą stanowić poważną przeszkodę w skutecznym leczeniu depresji. W większości przypadków efekty uboczne leków przeciwdepresyjnych są odwracalne na skutek zmniejszenia dawki stosowanych leków [5, 18, 25], aczkolwiek w wielu przypadkach zmniejszenie dawki może prowadzić do zahamowania efektu terapeutycznego [26]. Niestety aktualne metody oceny negatywnego wpływu antydepresantów na zdrowie i funkcjonowanie człowieka są zazwyczaj ukierunkowane na wykrywanie skutków, a nie mechanizmów ich działania [27].

Ponadto, leki przeciwdepresyjne mogą mieć negatywny wpływ na całokształt reakcji seksualnych człowieka, które z kolei mogą znacząco wpływać na jakość życia, poczucie własnej wartości oraz stan zdrowia psychicznego [28, 29]. Częstotliwość występowania zaburzeń seksualnych związanych z LPD różni się znacząco pomiędzy badaniami, przez co trudno jest dokładnie ocenić ich występowanie. Odnotowane problemy dotyczą zmniejszonego popędu płciowego, obniżonej pobudliwości seksualnej oraz problemów z utrzymaniem erekcji i opóźnionym wytryskiem (Fig. 1.2.) [30, 31].

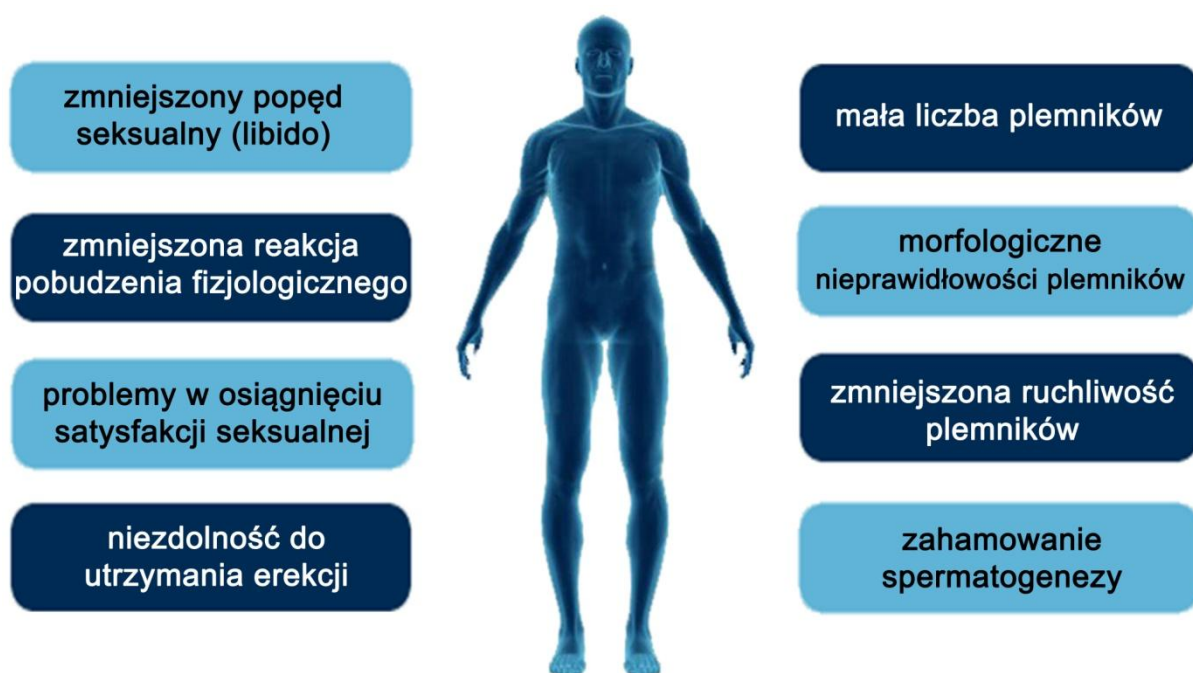


Fig. 1.2. Najczęściej obserwowane seksualne skutki uboczne stosowania leków przeciwdepresyjnych u mężczyzn (opracowanie własne).

Seksualne skutki uboczne leczenia depresji odnotowano praktycznie wśród każdej grupy leków przeciwdepresyjnych. Wyniki badań sugerują, iż leki przeciwdepresyjne nowej generacji wykazują bardziej korzystny profil dysfunkcji seksualnych w porównaniu do innych leków przeciwdepresyjnych [32, 33]. Większość antydepresantów zmienia stężenie serotoniny, dlatego powszechnie uważa się, że jej podwyższony poziom obniża funkcje seksualne. Stosowanie leków może prowadzić do bezpośredniego uszkodzenia błony komórkowej oraz integralności komórkowego DNA, tym samym powodując redukcję liczby plemników, zaburzenia ruchliwości oraz anomalie dotyczące wyglądu morfologicznego [34, 35].

Biorąc pod uwagę powyższe, wydaje się, że to właśnie toksyczność leków wobec komórek rozrodczych ma fundamentalne znaczenie ze względu na możliwość ich transmisji do przyszłych pokoleń [36, 37].

1.3.1. Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TCAs)

Leki trójpierścieniowe (ang. *tricyclic antidepressants*, TCAs) są powszechnie stosowane w przypadkach stwierdzenia zaburzeń depresyjnych, stanów lękowych oraz migreny [38]. Potencjalne skutki uboczne leków trójpierścieniowych są bardzo poważne, szczególnie w sytuacji przekroczenia zalecanych dawek. Typowe efekty niepożądane mogą obejmować: suchość w jamie ustnej, senność, zawroty i bóle głowy oraz arytmie [39]. W przypadku dysfunkcji seksualnych, najczęściej odnotowywane objawy dotyczą (częstotliwość 30 %): zmniejszone libido, zaburzenia erekcji [4] oraz opóźniony wytrysk [4, 5]. Z kolei wtórne efekty odnotowane w mniejszym stopniu dotyczą zmniejszenia nocnych erekcji [30], bolesnej ejakulacji [30, 40, 41] oraz trudności z osiągnięciem orgazmu [42]. W istocie, działania leków trójpierścieniowych prowadzą do znacznych, lecz odwracalnych zaburzeń w procesie spermatogenezy [30, 43]. Kontynuując, badania nad lekami przeciwdepresyjnymi wskazują na ujemną korelację między jakością nasienia i TCAs [44, 45].

W dostępnym piśmiennictwie zostały udokumentowane przykłady strukturalnych oraz liczbowych nieprawidłowości chromosomowych w komórkach somatycznych i rozrodczych [23]. Dodatkowo, obserwowano zmniejszenie indeksu mitotycznego, spadek liczby podziałów mejotycznych oraz liczne zaburzenia morfologiczne plemników. Wszystkie nieprawidłowości są bezpośrednio związane z dawkami stosowanych leków [23, 24].

1.3.2. Inhibitory monoaminooksydazy (MAOIs)

Leki z grupy MAOIs (ang. *monoamine oxidase inhibitors*) należą do najstarszych leków przeciwdepresyjnych – tzw. leków pierwszej generacji. Starsze leki przeciwdepresyjne mają na ogół wyższy wskaźnik efektów ubocznych w kontekście zaburzeń seksualnych niż nowsze leki drugiej generacji [14, 25, 26, 46].

Działania niepożądane MAOIs często obejmują: senność, zawroty głowy, bóle mięśni, mdłości, zmęczenie, trudności z zasypianiem oraz w rzadkich przypadkach niebezpieczny wzrost ciśnienia krwi [47]. Aktualne badania wskazują, że MAOIs mogą powodować zaburzenia seksualne związane ze zmniejszonym libido, trudnościami z osiągnięciem orgazmu oraz utrzymaniem erekcji (częstotliwość 40 %) [30, 47]. Badania na zwierzętach wskazują, że działania niepożądane występujące u osobników dorosłych są odwracalne w sposób bezpośrednio zależny od dawki. Oprócz tego, dane wskazują, że leki tej grupy powodują zmniejszenie ilości plemników, prowadząc w pewnym stopniu do zahamowania procesu spermatogenezy u mężczyzn oraz różnych modeli zwierzęcych [48].

1.3.3. Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRIs)

SSRI (ang. *selective serotonin reuptake inhibitor*) stanowią grupę najnowszych antydepresantów pierwszego wyboru [49-51]. Leki należące do tej grupy mają mniej skutków ubocznych niż starsze leki przeciwdepresyjne, jednakże nie są ich całkowicie pozbawione [52]. Najczęściej występujące efekty uboczne to bóle głowy, mdłości, podenerwowania, bezsenność, nadmierne pocenie oraz ziewanie [53]. W dostępnym piśmiennictwie odnotowano również przypadki seksualnych skutków ubocznych związanych z stosowaniem leków z grupy SSRI (częstotliwość 25 % - 73 %) [25, 29, 52, 54]. Randomizowane, kontrolowane pod względem placebo, wielokrotnie ślepe badania porównawcze przeprowadzone na ludziach [55-58] wyszczególniają najczęstsze z nich: zmniejszenie popędu płciowego (libido) [5, 30, 59-62], zmniejszenie reakcji pobudzenia fizjologicznego – spadek erekcji u mężczyzn oraz problemy z osiągnięciem zaspokojenia seksualnego [30, 59, 63].

Druga grupa badań z kolei, koncentruje się głównie na działaniach niepożądanych w stosunku do parametrów nasienia [26, 35]. Doświadczenia prowadzone na zwierzętach wskazały wyraźnie negatywny wpływ leków na jakość nasienia (ruchliwość plemników), a także zaburzenia dotyczące liczby chromosomów (trisomie i polisomie) oraz uszkodzenia integralności DNA, sugerując plemnikobójcze działanie SSRI [15, 19]. Każdy parametr analizowanego nasienia był istotnie

skorelowany z czasem leczenia [30, 35, 43, 54]. Niezależnie od różnic pomiędzy SSRI, wszystkie wydają się mieć opóźniony mechanizm działania terapeutycznego, natomiast skuteczność ich działania zdaje się być bardzo zbliżona [64].

1.3.4. Inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRIs)

SNRI (ang. *serotonin norepinephrine reuptake inhibitor*) stanowią grupę leków skutecznych w łagodzeniu objawów depresji. Tak jak większość leków przeciwdepresyjnych, SNRI działają poprzez zwiększenie neurotransmisji serotonergicznej i noradrenergicznej, natomiast istotne działania niepożądane częściowo ustępują po kilku tygodniach leczenia. Najczęściej występujące objawy to głównie podwyższone ciśnienie krwi, nudności, zawroty i bóle głowy, nadmierne pocenie się oraz zmęczenie [65, 66].

Z punktu widzenia zaburzeń seksualnych, pacjenci stosujący leki SNRI tolerują je stosunkowo dobrze [5]. Zgłaszane seksualne skutki uboczne leków z grupy SNRI dotyczą najczęściej zmniejszenia popędu płciowego, trudności z osiągnięciem orgazmu lub niemożności utrzymania erekcji (częstotliwość 58 % - 70 %) [30, 49, 67].

Podsumowując, pomimo względnego bezpieczeństwa stosowania leków przeciwdepresyjnych, badania sugerują, że mogą one powodować niezamierzone skutki uboczne. Zaburzenia funkcji seksualnych w istotny sposób negatywnie wpływają na jakość życia, poczucie własnej wartości, niepokój oraz relacje seksualne z partnerem [8, 26].

Rosnąca świadomość dotycząca skutków ubocznych leków przeciwdepresyjnych doprowadziła do prób wprowadzenia substancji wspomagających lub terapii alternatywnych. Istniejące piśmiennictwo potwierdza zaburzenia seksualne jako możliwy efekt uboczny leczenia farmakologicznego depresji jednakże brak szczegółowych doniesień na temat mechanizmów działania antydepresantów w stosunku do komórek układu rozrodczego zachęca do podjęcia badań w tym zakresie [4, 30].

Nie jest jasne, czy skutki uboczne stosowania leków przeciwdepresyjnych wynikają głównie z ich bezpośrednich efektów farmakologicznych [26].

Prawdopodobnie leki przeciwdepresyjne mogą bezpośrednio wpływać na płodność mężczyzn poprzez zaburzenia produkcji plemników lub pośrednio, zmieniając równowagę hormonalną i funkcjonowanie seksualne. Większość efektów ubocznych jest odwracalna po krótkotrwałym stosowaniu leków z nielicznymi wyjątkami, których skutki mogą być trwałe. Wiele leków, których stosowanie wydaje się nie mieć żadnego wpływu na podstawowe parametry nasienia w rzeczywistości może wpływać na płodność i jakość nasienia poprzez bardziej subtelne mechanizmy powodując uszkodzenia DNA. W przyszłości, metody diagnostyczne oparte na modelowych układach *in vitro* spermatogenezy, będą stanowiły istotne narzędzie do pełniejszego poznania mechanizmów molekularnych związanych z występowaniem skutków ubocznych podczas leczenia przeciwdepresyjnego.

2. Cel pracy i hipoteza badawcza

Cel prowadzonych badań:

Zasadniczym celem naukowym planowanych badań była ocena potencjalnej toksyczności leków przeciwdepresyjnych o różnym mechanizmie działania na komórki szlaku spermatogenezy, a w szczególności uzyskanie odpowiedzi na szereg następujących pytań:

- W jakim stopniu badane leki wpływają na żywotność, proliferację oraz równowagę oksydacyjno-redukcyjną mysich linii komórkowych (GC-1spg i GC-2spd)?
- Czy badane leki powodują uszkodzenia materiału genetycznego na poziomie molekularnym?
- Czy i w jakim stopniu badane leki wpływają na zmianę aktywności kluczowych genów związanych z tworzeniem wrzeciona kariokinetycznego podczas pierwszego podziału mejotycznego?
- Jaki jest mechanizm toksyczności badanych leków na komórki szlaku spermatogenezy?

Hipoteza badawcza:

- Leki przeciwdepresyjne działają toksycznie względem komórek rozrodczych, co może stanowić bezpośrednią przyczynę obniżonej męskiej płodności osobniczej.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał doświadczalny

Materiał do badań stanowiły dwie komercyjnie dostępne mysie linie komórkowe:

- linia spermatogonii typu B (GC-1 spg) (ATCC: CRL-2053, USA)
- linia spermatocytów (GC-2 spd) (ATCC: CRL-2196, USA)

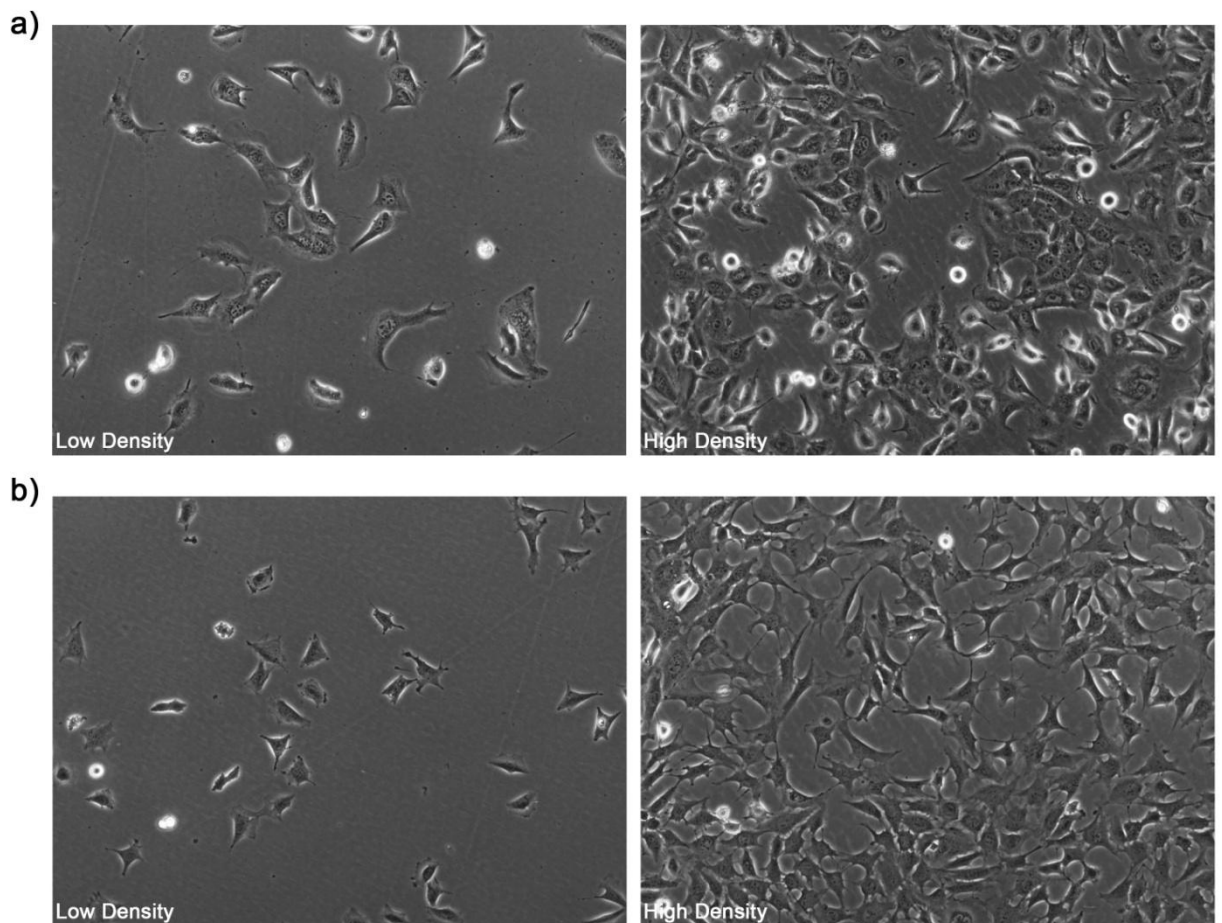
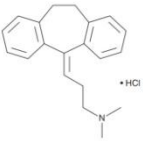
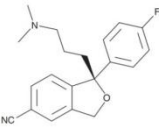
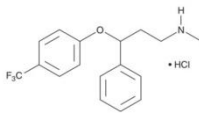
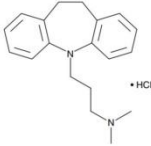
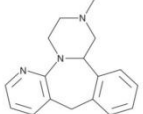

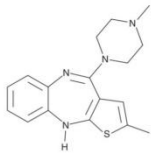

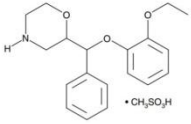

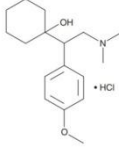



Fig. 3.1. Zdjęcie mikroskopowe badanych linii komórkowych, a) GC-1 spg, b) GC-2 spd (źródło: ATCC).

Leki przeciwdepresyjne wykorzystane do badań Tab. 3.1. (Cayman Chemical, USA):

Tab. 3.1. Charakterystyka leków przeciwdepresyjnych.

Nazwa leku	Stosowany skrót	Charakterystyka
amitryptylina	AMI	<p>PRODUCT INFORMATION</p> <p>Amitriptyline (hydrochloride) Item No. 15881</p> <p>CAS Registry No.: 549-18-8 Formal Name: 3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-ylidene)-N,N-dimethyl-1-propanamine, monohydrochloride Synonyms: NIH 10794, Ro 4-1575 MF: $C_{20}H_{23}N \cdot HCl$ FW: 313.9 Purity: $\geq 98\%$ UV/Vis: λ_{max}: 239 nm Supplied as: A crystalline solid Storage: $-20^{\circ}C$ Stability: ≥ 2 years</p> <p>Information represents the product specifications. Batch specific analytical results are provided on each certificate of analysis.</p> 
escitalopram	ESC	<p>PRODUCT INFORMATION</p> <p>Escitalopram Item No. 22405</p> <p>CAS Registry No.: 128196-01-0 Formal Name: (1S)-1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-5-isobenzofurancarboxonitrile Synonym: (S)-Citalopram MF: $C_{20}H_{21}FN_2O$ FW: 324.4 Purity: $\geq 98\%$ UV/Vis: λ_{max}: 241 nm Supplied as: A solution in ethanol Storage: $-20^{\circ}C$ Stability: ≥ 1 year</p> <p>Information represents the product specifications. Batch specific analytical results are provided on each certificate of analysis.</p> 
fluoksetyna	FLU	<p>PRODUCT INFORMATION</p> <p>Fluoxetine (hydrochloride) Item No. 14418</p> <p>CAS Registry No.: 56296-78-7 Formal Name: N-methyl-γ-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]-benzene-propanamine, monohydrochloride Synonym: LY110140 MF: $C_{17}H_{18}F_3NO \cdot HCl$ FW: 345.8 Purity: $\geq 98\%$ UV/Vis: λ_{max}: 226, 268, 276 nm Supplied as: A crystalline solid Storage: $-20^{\circ}C$ Stability: ≥ 2 years</p> 
imipramina	IMI	<p>Product Information</p> <p>Imipramine (hydrochloride) Item No. 15890</p> <p>CAS Registry No.: 113-52-0 Formal Name: 10,11-dihydro-N,N-dimethyl-5H-dibenz[b,f]azepine-5-propanamine, monohydrochloride Synonyms: Melipramine, Tofranil MF: $C_{19}H_{21}N_2 \cdot HCl$ FW: 316.9 Purity: $\geq 98\%$ Stability: ≥ 2 years at $-20^{\circ}C$ Supplied as: A crystalline solid UV/Vis: λ_{max}: 212, 250 nm</p> 

mirtazapina	MIR	<p>PRODUCT INFORMATION</p> <p>Mirtazapine Item No. 19994</p> <p>CAS Registry No.: 85650-52-8 Formal Name: 1,2,3,4,10,14b-hexahydro-2-methyl-pyrazino[2,1-a]pyrido[2,3-c][2]benzazepine 6-Azamienserin, ORG 3770</p> <p>Synonyms: MF: $C_{17}H_{19}N_3$ FW: 265.4 Purity: $\geq 98\%$ UV/Vis.: λ_{max}: 293 nm Supplied as: A crystalline solid Storage: -20°C Stability: As supplied, 2 years from the QC date provided on the Certificate of Analysis, when stored properly</p>  
olanzapina	OLZ	<p>PRODUCT INFORMATION</p> <p>Olanzapine Item No. 11937</p> <p>CAS Registry No.: 132539-06-1 Formal Name: 2-methyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl)-10H-thieno[2,3-b][1,5]benzodiazepine LY170053</p> <p>Synonym: MF: $C_{21}H_{20}N_4S$ FW: 312.4 Purity: $\geq 98\%$ UV/Vis.: λ_{max}: 226, 272 nm Supplied as: A crystalline solid Storage: -20°C Stability: ≥ 2 years <i>Information represents the product specifications. Batch specific analytical results are provided on each certificate of analysis.</i></p>  
reboksetyna	REB	<p>Product Information</p> <p>Reboxetine (mesylate) Item No. 15038</p> <p>CAS Registry No.: 98769-84-7 Formal Name: (2R)-rel-2-((R)-(2-ethoxyphenoxy)phenylmethyl)-morpholine, methanesulfonate Daxetas, Edronax, FCE 20124, PNU 155950E MF: $C_{17}H_{19}NO_3 \cdot CH_3SO_3H$ FW: 409.5 Purity: $\geq 98\%$ Stability: ≥ 2 years at -20°C Supplied as: A crystalline solid UV/Vis.: λ_{max}: 276 nm</p>  
wenlafaksyna	VEN	<p>PRODUCT INFORMATION</p> <p>Venlafaxine (hydrochloride) Item No. 11567</p> <p>CAS Registry No.: 99300-78-4 Formal Name: 1-[2-(dimethylamino)-1-(4-methoxyphenyl)ethyl]-cyclohexanol, monohydrochloride Wy 45030 MF: $C_{17}H_{23}NO_2 \cdot HCl$ FW: 313.9 Purity: $\geq 98\%$ Supplied as: A neat solid Storage: -20°C Stability: ≥ 5 years Special Conditions: Light sensitive <i>Information represents the product specifications. Batch specific analytical results are provided on each certificate of analysis.</i></p>  

Wszystkie leki zostały rozpuszczone w DMSO (Sigma, Niemcy) zgodnie z kartą charakterystyki substancji chemicznej dołączonej przez producenta (szczegółowa informacja poniżej).

3.2. Metody

3.2.1. Hodowla *in vitro* linii komórkowych GC-1 spg oraz GC-2 spd

Odczynniki:

- a) medium hodowlane DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) zawierające glukozę 4.5 g/L, czerwień fenolową, węglan oraz pirogronian sodu, filtrowane (0.2 μ m) (Corning, USA),
- b) płodowa surowica bydlęca FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*) inaktywowana termicznie (Biowest, Francja),
- c) mieszanina antybiotyków z L-glutaminą 100x (Biowest, Francja):
 - L-glutamina: 29.2 mg/ml,
 - penicylina G: 10 000 U/ml,
 - streptomycyna: 10 mg/ml,
- d) bufor PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*) (Gibco, USA),
- e) 0.25% roztwór trypsyny z 0.02% dodatkiem EDTA (Thermo Fisher Scientific, USA).

Wykonanie:

Pierwszym etapem przy pracy z liniami komórkowymi było przygotowanie pełnego medium hodowlanego w sterylnych warunkach. W tym celu, podłoże DMEM (przechowywane w 4°C i ogrzewane do temperatury 37°C tuż przed użyciem) zostało uzupełnione 10 % FBS oraz 1x mieszaniną antybiotyków z L-glutaminą. Całość dokładnie wymieszano, a następnie do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² wprowadzono 5 ml pełnego medium DMEM. Do tak przygotowanych butelek wprowadzono komórki linii GC-1 spg oraz GC-2 spd bezpośrednio po ich rozmrożeniu w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Hodowle *in vitro* prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C z 5 % atmosferą CO₂ i 95 % wilgotnością (Galaxy 170 R New Brunswick, USA). Medium hodowlane było zmieniane co 48h. Po

osiągnięciu ~80% konfluencji komórki pasażowano. W tym celu powierzchnia butelki została przemyta niewielką ilością buforu PBS (1 ml), a następnie dodano 0.25 % roztwór trypsyny (1 ml). Pod mikroskopem odwróconym wyposażonym w kamerę monochromatyczną CCD (Zeiss Axiowert 40 CFL, oprogramowanie AxioVs 40 V 4.8.1.0, USA) monitorowano stopień odklejenia komórek od dna naczynia hodowlanego. Działanie trypsyny zostało zneutralizowane poprzez dodanie pełnego medium (1 ml), po czym komórki przeniesiono do probówek typu falcon i odwirowano przy prędkości 300 x g, 5 min (RT) i zawieszono w 1-5 ml świeżego medium DMEM. Gęstość zawiesiny komórkowej określano przy użyciu hemocytometru (komory Bürkera), a następnie komórki wysiewano w ilości 1×10^3 komórek/cm². Obserwacje i dokumentację fotograficzną wykonywano przy powiększeniu 10× w mikroskopie odwróconym. Wszystkie prace z komórkami były prowadzone w sterylnych warunkach w komorze z laminarnym przepływem powietrza, wysterylizowanej uprzednio poprzez naświetlanie światłem UV (ESCO class II BSC, USA).

3.2.2. Przygotowanie roztworów leków

Odczynniki:

- a) leki przeciwdepresyjne: 1) amitryptylina, 2) escitalopram, 3) fluoksetyna, 4) imipramina, 5) mirtazapina, 6) olanzapina, 7) reboksetyna, 8) wenlafaksyna (Cayman Chemical, USA),
- b) rozpuszczalnik dla leków: DMSO (Sigma, Niemcy).

Wykonanie:

Na podstawie masy molowej obliczono ilość każdego leku jaką należy odważyć celem przygotowania roztworu wyjściowego o stężeniu 100 mM. Następnie dodano rozpuszczalnik DMSO i wymieszano do całkowitego rozpuszczenia osadu. Tak uzyskany roztwór rozpipetowano do mniejszych probówek i przechowywano w temperaturze -20°C. Kolejno, bezpośrednio przed właściwym eksperymentem przygotowano dalsze rozcieńczenia poprzez rozcieńczenie wyjściowego roztworu.

Każde kolejne rozcieńczenie było przygotowywane w pełnym medium DMEM w szerokim zakresie stężeń, tj.:

- 1) amitryptylina: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 [μM]
- 2) escitalopram: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100 [μM]
- 3) fluoksetyna: 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 [μM]
- 4) imipramina: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 [μM]
- 5) mirtazapina: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 [μM]
- 6) olanzapina: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 125, 150 [μM]
- 7) reboksetyna: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 [μM]
- 8) wenlafaksyna: 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600 [μM]

W dalszym etapie, rozcieńczenia były dodawane do naczyń hodowlanych w wybranym stężeniu w zależności od eksperymentu (stężenia zostały podane niezależnie dla każdej metodyki).

3.2.3. Ocena aktywności metabolicznej komórek – test MTT

Odczynniki:

- a) DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Corning, USA),
- b) roztwór wyjściowy soli MTT (ang. *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) w stężeniu 5 mg/ml przygotowany w buforze DPBS (Cayman Chemical, USA),
- c) rozpuszczalnik - sulfotlenek dimetylu DMSO (Sigma, Niemcy).

Wykonanie:

Komórki wysiano w pełnym medium DMEM na przezroczyste płytki 96-dołkowe o płaskim dnie w gęstości 3×10^3 komórek/ cm^2 (powierzchnia dołka 0.32 cm^2). Po 24h medium zebrano, a następnie dodano nowe medium zawierające leki w szerokim zakresie stężeń zgodnie z metodyką pkt 3.2.2. W komórkach kontrolnych dodano pełne medium DMEM bez leków. Płytki pozostawiono w inkubatorze przez 24, 48, 72 oraz 96h. W przypadku inkubacji 72 i 96h medium zostało zmienione na świeże po upływie 48h. Po zakończeniu każdego czasu

inkubacji, do płytek dodano 20 μ l roztworu MTT (w stężeniu 5 mg/ml) i ponownie umieszczono w inkubatorze na okres 4h. Następnie medium delikatnie odciągnięto, a powstałe kryształy rozpuszczono w objętości 100 μ l DMSO/dołek. Płytki przykryto folią aluminiową, przeniesiono na wytrząsarkę orbitalną i pozostawiono na 3 min, aż do momentu rozpuszczenia wszystkich kryształów. Spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji dokonano przy użyciu czytnika wielodetekcyjnego (PerkinElmer Victor X4 2030, USA) przy długości fali 590 nm z uwzględnieniem fali referencyjnej o długości 620 nm. Aktywność metaboliczna komórek obu badanych linii została obliczona jako ΔA ($A_{590} - A_{620}$). Wyniki podano jako aktywność metaboliczną komórek w %, natomiast wartość kontroli przyjęto jako 100%.

3.2.4. Oznaczenie równowagi redoks (RFT, RFA, redukcja glutationu)

Odczynniki:

- a) sonda dihydroetydyna (DHE) 5 mM (Thermo Fisher Scientific, USA),
- b) sonda 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceina (DAF-FM) 5 mM (Thermo Fisher Scientific, USA),
- c) sonda Thiol Tracker Violet 20 mM (Gibco, USA),
- d) bufor PBS-glukoza-EDTA: 0.1% glukoza, 0.5 mM EDTA w PBS.

Wykonanie:

Komórki wysiano na płytki 96-dołkowe (czarne, o przezroczystym i płaskim dnie) w gęstości 3×10^3 komórek/cm² (powierzchnia dołka 0.32 cm²). Po 24h dodano badane leki w pojedynczym, wybranym na podstawie testu MTT stężeniu (AMI 10 μ M, ESC 30 μ M, FLU 5 μ M, IMI 20 μ M, MIR 150 μ M, OLZ 40 μ M, REB 30 μ M, VEN 250 μ M). Tak przygotowane płytki inkubowano przez 48h i 96h w standardowych warunkach. Po zakończeniu czasu inkubacji, komórki przepłukano buforem DPBS i zawieszono w 100 μ l przygotowanej mieszaniny o składzie: bufor PBS-glukoza-EDTA oraz wybrana sonda fluorescencyjna (stężenie końcowe każdej z nich to 5 μ M). Płytki inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Analizę przeprowadzono za pomocą cytometru obrazowego InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare, USA). Pomiaru intensywności fluorescencji wykonano przy

zastosowaniu dołączonego do urządzenia oprogramowania (kanał niebieski – DAPI, zielony – FITC, czerwony – Texas Red). Wyniki podano jako jednostki względnej fluorescencji RFU (ang. *relative fluorescence unit*).

3.2.5. Ocena zmian morfologicznych

Wykonanie:

Komórki linii GC-1 spg oraz GC-2 spd zostały wysiane na przezroczyste płytki 6-dołkowe o płaskim dnie w gęstości 3×10^3 komórek/cm² (powierzchnia dołka 9.6 cm²). Po upływie 24h, medium odciągnięto i dodano nowe z lekami w odpowiednich stężeniach. W dołkach kontrolnych zmieniono medium na świeże (bez dodatku leków). Komórki inkubowano przez 96h (zmiana medium po 48h), wykonując dokumentację fotograficzną co 12, 24, 48, 72, 96h za pomocą mikroskopu odwróconego wyposażonego w kamerę monochromatyczną CCD (Zeiss Axiowert 40 CFL, oprogramowanie AxioVs 40 V 4.8.1.0, USA).

3.2.6. Analiza przemian energetycznych komórek

Odczynniki:

- a) komercyjny zestaw ATPlite (PerkinElmer, USA):
 - liofilizowany roztwór substratu,
 - roztwór lizujący komórki (MCLS),
 - roztwór buforu substratu,
 - liofilizowany roztworu standardowego ATP,
 - 96-dołkowa płytka (OptiPlate-96hS).

Wykonanie:

Procedura została wykonana zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Komórki wysiano na nieprzeźroczystą płytkę 96-dołkową w gęstości

3×10^3 komórek/cm² (powierzchnia dołka 0.32 cm²) i umieszczono w inkubatorze na 24h. Po tym czasie, medium zebrano, a komórki poddano działaniu leków w odpowiednich stężeniach w pełnym medium DMEM. W dołkach kontrolnych bez dodatku leku podłoże wymieniono na świeże. Płytki umieszczono w inkubatorze i poddano 48h i 96h inkubacji. Następnie, zawartość dołków zebrano, dodano po 100 µl roztworu lizującego i płytki wytrząsano przez 10 min. Kolejno, do każdego z dołków dodano po 50 µl roztworu substratu. Każdą studzienkę przepipetowano, a całe płytki inkubowano przez dokładnie 15 minut w ciemności. Po upływie tego czasu dokonano pomiaru luminescencji w czytniku wielodetekcyjnym (PerkinElmer Victor X4 2030, USA). Wyniki podano jako poziom komórkowego ATP %, natomiast wartość kontroli przyjęto jako 100%.

3.2.7. Analiza profilu cyklu komórkowego

Odczynniki:

- a) Barwnik Hoechst 33342 (Sigma, Niemcy),
- b) DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Corning, USA).

Wykonanie:

Komórki zostały wysiane na czarne 96-dołkowe płytki dedykowane do technik fluorescencyjnych w gęstości 3×10^3 komórek/cm² (powierzchnia dołka 0.32 cm²), a następnie umieszczone w inkubatorze na 24h. Dalej, komórki poddano działaniu leków w odpowiednio przygotowanych stężeniach, a płytki odstawiono do inkubatora na 48h i 96h. Po zakończeniu inkubacji, medium odciągnięto, a komórki przepłukano roztworem DPBS i zawieszono w 100 µl mieszaniny barwnika Hoechst 33342 (1 µg/ml) w medium DMEM niezawierającym FBS oraz mieszaniny antybiotyków. Płytkę odstawiono na 20 min w 37°C. Następnie wykonano dokumentację zdjęć fluorescencyjnych przy użyciu cytometru obrazowego InCell Analyzer 2000. Oceny cyklu komórkowego dokonano w wyniku pomiaru intensywności fluorescencji z zastosowaniem programu ImageJ z wtyczką do analizy profilu cyklu komórkowego (DNA Cell Cycle plug-in). Wyniki podano jako % wszystkich komórek.

3.2.8. Detekcja uszkodzeń – powstawanie mikrojąder (MN)

Odczynniki:

- a) DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Corning, USA),
- b) 3.7% formaldehyd (Chempur, Polska),
- c) barwnik Hoechst 33258 (Sigma, Niemcy).

Wykonanie:

Komórki zostały rutynowo wysiane na czarne 96-dołkowe płytki dedykowane do technik fluorescencyjnych. Kolejno, dodano leki i całość inkubowano 48h i 96h. Następnie, komórki utrwalono w 3.7% formaldehydzie (20 min, RT – temperatura pokojowa, ang. *room temperature*) i dodano 100 µl mieszaniny barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33258 (1 µg/ml) przygotowanego w medium hodowlanym DMEM. Płytki pozostawiono na 10 min inkubacji w RT. Dalej, dołki przepłukano i zawieszono w 100 µl DPBS. Ilościowej oceny mikrojąder dokonano na podstawie obserwacji dokumentacji fotograficznej wykonanych przy użyciu cytometru obrazowego InCell Analyzer 2000. Wyniki podano jako ilość komórek posiadających mikrojądra na tle wszystkich przeanalizowanych komórek wyrażone w %.

3.2.9. Izolacja całkowitego RNA

Odczynniki:

- a) DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Corning, USA),
- b) odczynnik TRI (Sigma, Niemcy),
- c) izopropanol (Sigma, Niemcy),
- d) chloroform (Chempur, Polska),
- e) woda pozbawiona RN-az i DN-az (Sigma, Niemcy).

Wykonanie:

Komórki linii GC-1 spg oraz GC-2 spd wysiano do butelek hodowlanych o pojemności 25cm² w 5 ml pełnego medium DMEM w gęstości 3 x 10³ komórek/cm². Dalej, komórki poddano działaniu leków w odpowiednim stężeniu i odstawiono na 48h i 96h inkubacji. Następnie, rozpoczęto procedurę izolacji RNA zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta dla odczynnika TRI. Z naczyń hodowlanych usunięto medium, a komórki przepłukano 2 x sterylnym buforem DPBS. Dodano 1 ml odczynnika TRI do każdej butelki i pozostawiono do całkowitej lizy komórek (zmiany obserwowano pod mikroskopem odwróconym). Tak uzyskaną zawiesinę przeniesiono do probówek typu eppendorf 1.5 ml. Kolejno, dodano 200 µl chloroformu, energicznie wytrząsano przez 15 s i odwirowano 12000 x g w 4°C. Po wirowaniu, górną frakcję zebrano, przeniesiono do nowej probówki i RNA strącono za pomocą 500 µl izopropanolu. Wszystkie próbki odwirowano 12000 x g, a uzyskany biały osad przepłukano 75% etanolem i ponownie odwirowano. W ostatnim etapie osad pozostawiono do wysuszenia przez 10-15 min w termobloku w temperaturze 45°C. Po tym czasie uzyskany osad rozpuszczono w 50-100 µl sterylnej wody.

3.2.10. Ilościowa i jakościowa ocena preparatów RNA

Odczynniki:

- a) agaroz (Sigma, Niemcy),
- b) 1 x bufor TBE (Sigma, Niemcy),
- c) bufor obciążający (Sigma, Niemcy),
- d) bromek etydy (Sigma, Niemcy),
- e) woda pozbawiona RN-az i DN-az (Sigma, Niemcy).

Wykonanie:

Stężenie oraz czystość uzyskanych preparatów oceniono poprzez pomiar absorpcji światła UV. W tym celu przeprowadzono pomiar stosunku absorbancji przy długości fali A260/A280 nm na spektrofotometrze typu Nanodrop 2000 (Thermo

Fischer, USA). Stężenie wyrażono w jednostkach $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Następnie, preparaty zostały poddane ocenie jakościowej przy użyciu elektroforezy w 0.8% żelu agarozowym. Celem wizualizacji struktury kwasów nukleinowych na transiluminatorze UV dodano 1 μl bromku etydyny. Na tak przygotowany żel nakładano próbki (0.5 μg RNA z 2 μl buforu obciążającego). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono przy napięciu 80 V przez 1 godzinę. Oceny preparatów dokonano z użyciem systemu do wizualizacji żeli Fusion Fx7 (ViberLourant, USA) wyposażonego w kamerę CCD, a także oprogramowania Fusion software.

3.2.11. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA (Real – Time PCR)

Synteza cDNA oraz amplifikacja z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym

Odczynniki:

- a) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA):
 - 10 x RT buffer,
 - 10 x RT Random Primers,
 - 25 x dNTP Mix,
 - MultiScribe Reverse Transcriptase,
 - RNase Inhibitor,
 - Nuclease- free H₂O.
- b) TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA),
- c) Sondy molekularne (Applied Biosystems, USA):
 - TaqMan Gene Expression Assay, Gene Symbol: *SCP1*
 - TaqMan Gene Expression Assay, Gene Symbol: *SCP3*
 - TaqMan Gene Expression Assay, Gene Symbol: *NuMa*
 - TaqMan Gene Expression Assay, Gene Symbol: *18s rRNA*
- d) woda pozbawiona RN-az i DN-az (Sigma, Niemcy).

Wykonanie:

Syntezę cDNA przeprowadzono z użyciem komercyjnego zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) zgodnie z zaleceniami producenta. Zestaw wykorzystuje startery oligo(dT) komplementarne wyłącznie do cząsteczki mRNA. Do syntezy użyto 2 µg całkowitego RNA. Sporządzono master mix zgodnie z protokołem i zmieszano z preparatami RNA w stosunku 1:1 uzyskując końcową objętość próbki 20 µl. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w termocyklerze z następującym profilem czasowo/temperaturowym: Etap I przyłączanie starterów: 25°C/10 min, Etap II właściwa reakcja odwrotnej transkrypcji: 37°C/120 min, Etap III inaktywacja enzymu: 85°C/5 min. Po zakończeniu programu, próbki zostały przechowywane w -20°C do dalszych analiz.

W reakcji Real-time PCR zastosowano komercyjnie dostępne sondy TaqMan oraz mieszaninę reakcyjną TaqMan Gene Expression Master Mix dedykowaną dla tego typu sond. Reakcję przeprowadzono na 96 dołkowych płytkach w objętości końcowej 10 µl i przy następującym profilu czasowo/temperaturowym: denaturacja wstępna 2 min/95°C, denaturacja właściwa 15 s/95°C, synteza 1 min/60°C. Liczba cykli reakcyjnych 40. Eksperyment znormalizowano względem genu referencyjnego *18S rRNA*. Analizę przyrostu produktu oceniano poprzez pomiar intensywności fluorescencji sondy, natomiast do analizy ekspresji wybranych genów użyto metody komparatywnej $2^{-\Delta\Delta CT}$. Wyniki przedstawiono jako różnicę poziomu ekspresji badanego genu między próbkami badanymi, a próbą referencyjną.

3.2.12. Analiza poziomu syntezy białek (technika Western Blot)

Izolacja lizatów białkowych z hodowli oraz oznaczenie stężenia białek metodą BCA

Odczynniki:

- a) DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Corning, USA),
- b) roztwór 0.25 % trypsyny z 0.02 % EDTA (Biowest, Francja),

- c) bufor lizujący (RIPA):
 - 50 mM Tris- HCl pH 7.5 (Sigma, Niemcy),
 - 1 % NP40 (Sigma, Niemcy),
 - 0.5 % deoksycholalan sodu (Sigma, Niemcy),
 - 0.1 % SDS (Sigma, Niemcy),
 - 150 mM NaCl (Sigma, Niemcy),
 - 1 mM EDTA (BioShop, USA),
 - 1 mM PMSF (ROTH, Niemcy),
- a) zestaw do oznaczania białka metodą BCA (Thermo Fisher Scientific, USA):
 - odczynnik A: BCA (kwas bincynchoninowy),
 - odczynnik B: 4% siarczan miedzi,
- b) roztwór wzorcowy albuminy (BSA) (Sigma, Niemcy),
- c) bufor próbkowy LB (5x):
 - 25 % β -merkaptoetanol (Sigma, Niemcy),
 - 0.3 M Tris-HCl pH 6.8 (Sigma, Niemcy),
 - 50 % glicerol (Sigma, Niemcy),
 - 0.05 % błękit bromofenolowy (Sigma, Niemcy),
 - 10 % SDS (Sigma, Niemcy),
- d) lizaty białkowe.

Wykonanie:

Komórki badanych linii wysiano w gęstości 3×10^3 komórek/cm² do butelek hodowlanych o pojemności 75 cm² w 15 ml pełnego medium DMEM. Następnie, komórki poddano działaniu leków przez 48h i 96h. Po zakończeniu inkubacji medium zebrano, butelki przepłukano DPBS i zawieszono w 0.25 % roztworu trypsyny, aż do momentu oderwania komórek od podłoża naczynia hodowlanego. Działanie trypsyny zostało zatrzymane poprzez dodanie pełnego medium DMEM. Następnie preparaty odwirowano, a osad zawieszono w 100-200 μ l zimnego buforu RIPA do lizy uzupełnionego inhibitorem proteaz w stosunku 1:100. Osad komórek inkubowano w termobloku z wytrząsaniem w 4°C i kilkakrotnie worteksowano aż do momentu całkowitego rozbicia osadu (około 30-45 min). Lizaty białek odwirowano 15000 x g, (15 min) w celu usunięcia pozostałości komórkowych. Klarowny supermatant

przeniesiono do nowych probówek i rozpoczęto procedurę oznaczania stężenia białek komercyjną metodą BCA.

Procedurę wykonano na płytkach 96-dołkowych. W tym celu sporządzono krzywą wzorcową poprzez seryjne rozcieńczenie BSA w buforze RIPA: 25, 125, 250, 500, 750, 1000 i 2000 mg/ml. Przygotowano również roztwór roboczy BCA mieszając odczynnik A i B w stosunku 50:1. Kolejno, do każdego z dołków rozpipetowano po 48 μ l roztworu roboczego BCA i 6 μ l lizatów białkowych/rozcieńczeń BSA do krzywej (stosunek 8:1). Płytkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 min, a następnie wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 562 nm na czytniku wielodetekcyjnym (PerkinElmer Victor X4 2030, USA). Na podstawie uzyskanych wyników, stężenie każdej z próbek doprowadzono do 1.5 μ g/ μ l dopełniając odpowiednią ilością buforu RIPA. W ostatnim etapie, poddano denaturacji w obecności buforu próbkowego w temperaturze 95°C przez 5 minut. Gotowe próbki schłodzono i przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

Identyfikacja białek z wykorzystaniem techniki Western Blot

Odczynniki:

- a) 30 % mieszanina monomerów akrylamid/ bisakrylamid (Bio-Rad, USA),
- b) 1.5 M Tris- HCl pH 8.8 (Sigma, Niemcy),
- c) 0.5 M Tris- HCl pH 6.8 (Sigma, Niemcy),
- d) 10 % SDS (Sigma, Niemcy),
- e) 10 % APS (nadsiarczan amonu) (Sigma, Niemcy),
- f) TEMED (Sigma, Niemcy),
- g) izopropanol (Chempur, Polska),
- h) bufor do elektroforezy SDS-PAGE o składzie:
 - 192 mM glicyna (Sigma, Niemcy),
 - 25 mM Tris (Sigma, Niemcy),
 - 0.1 % SDS (Sigma, Niemcy),
- i) bufor do transferu WB o składzie:
 - 192 mM glicyna (Sigma, Niemcy),
 - 25 mM Tris (Sigma, Niemcy),
 - 20 % (v/v) metanol (Chempur, Polska),
- j) bufor TBST pH 7.6 o składzie:

- 137 mM NaCl, (POCH, Polska),
 - 20 mM Tris (Sigma, Niemcy),
 - 0.1 % (v/v) Tween 20 (Sigma, Niemcy),
- k) marker wielkości białek (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) (Thermo Fisher Scientific, USA),
- l) albumina bydlęca (BSA) (Sigma, Niemcy),
- m) bufor blokujący: 1 % BSA w TBST,
- n) membrana PVDF o wielkości porów 0.45 μm (Thermo Fisher Scientific, USA),
- o) przeciwciała I rzędowe przygotowane w 1% BSA w TBST:
- królicze poliklonalne α - β -aktyna (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:10,000,
 - królicze poliklonalne α -NF- κ B (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:1000,
 - mysie monoklonalne α -FGF2 (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:1000,
 - mysie monoklonalne α -p16 (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:500,
 - królicze poliklonalne α -p21 (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:1000,
 - królicze poliklonalne α -p27 (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:1000,
 - królicze poliklonalne α -p53 (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:1000,
 - mysie monoklonalne α -TRF1 (Novus Biologicals, USA) 1:1000,
 - królicze poliklonalne α -TRF2 (Novus Biologicals, USA) 1:1000,
 - mysie monoklonalne α -kalneksyna (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:100,
 - królicze poliklonalne α -NuMa (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:1000,
 - królicze poliklonalne α -alfa-2a (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:500,
 - kozie poliklonalne α -SERT (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:200,
 - królicze poliklonalne α -SCP1 (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:100,
 - królicze poliklonalne α -SCP3 (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:2000,
 - mysie monoklonalne α -kaspaza 3 (Novus Biologicals, USA) 1:2000,
 - mysie monoklonalne α -Bcl-2 (Santa Cruz, USA) 1:100,
- p) przeciwciała II-rzędowe w 1% BSA w 1x TBST:
- królicze poliklonalne α -kozy sprężone z peroksydazą chrzanową (Santa Cruz, USA) 1:5000,
 - kozie poliklonalne α -królicze sprężone z peroksydazą chrzanową (Sigma, Niemcy) 1:80000,
 - królicze poliklonalne α -mysie sprężone z peroksydazą chrzanową (Sigma, Niemcy) 1:80000,

- q) bufor detekcyjny Clarity Western ECL Blotting Substrate, składający się z roztworów A (luminol/enhancer reagent) i B (peroxide reagent), przygotowany w stosunku 1:1 tuż przed użyciem (Bio-Rad, USA).

Wykonanie:

Na początku procedury przygotowano kasetę zawierającą dwuwarstwowy żel poliakrylamidowy do rozdzielania białek podczas elektroforezy SDS-PAGE. W tym celu, sporządzono mieszaninę 10 % żelu rozdzielającego: 4 ml 30 % roztwór akrylamid/bisakrylamid, 3 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 120 μ l 10 % SDS, 60 μ l 10 % APS, 6 μ l TEMED, 4.8 ml H₂O. Wszystkie składniki wymieszano i wprowadzono pomiędzy szkiełka, uzupełniając niewielką warstwą izopropanolu (na powierzchni) do czasu pełnej polimeryzacji żelu (około 45 min). W podobny sposób sporządzono mieszaninę dla 3.9 % żelu zagęszczającego: 670 μ l 30 % roztwór akrylamid/bisakrylamid, 1.25 ml Tris-HCl pH 6.8, 50 μ l 10 % SDS, 50 μ l 10 % APS, 5 μ l TEMED, 3 ml H₂O. Ponownie, składniki wymieszano, wprowadzono między szkiełka (po usunięciu izopropanolu), umieszczono grzebień i odstawiono na kolejne 45 min (czas polimeryzacji). Aparat do elektroforezy wypełniono zimnym buforem do elektroforezy, a następnie umieszczono w nim kasety z żelami. Do pierwszej studzienki wprowadzono 1 μ l markera, a do pozostałych po 25 μ l przygotowanych próbek (ilość białka w studzience równa 30 μ g). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono przy napięciu 90 V przez 25 minut dla żelu zagęszczającego, a następnie napięcie zwiększono do 130 V dla rozdzielania w żelu rozdzielającym (ok. 90 min). Po zakończeniu pełnego rozdzielania, przystąpiono do transferu „mokrego białek” na membranę PVDF. W tym celu żel został delikatnie wyjęty z kasety i umieszczony w „kanapce” transferowej złożonej odpowiednio z: kasety transferowej, gąbki, warstwy bibuły Whatman'a, żelu, membrany PVDF aktywowanej w metanolu (1 min), warstwy bibuły Whatman'a, gąbki i kasety transferowej z zamknięciem. Transfer prowadzono przez 100 min przy napięciu 100 V zapewniając odprowadzenie nadmiaru ciepła dzięki umieszczeniu całego układu w lodzie.

Po zakończeniu transferu, membrany umieszczono w buforze blokującym (1 % BSA w TBST, 60 min, kołysząc), a następnie membrany przeniesiono do roztworów specyficznych przeciwciał I-rzędowych i inkubowano przez 24 godziny w 4°C. Po upływie czasu inkubacji, membrany przepłukano w TBST 4 x 5 min, umieszczono w roztworze przeciwciał II rzędowych na 60 min w temperaturze

pokojuj, po czym ponownie przepłukano w TBST 4 x 5 min. Detekcję przeprowadzono za pomocą zestawu Clarity Western ECL Substrate. Na każdą z membran nałożono 1 ml substratu dla peroskydazy chrzanowej (5 min, w ciemności). Po zakończonej inkubacji odciągnięto nadmiar odczynnika i przeprowadzono detekcję przy użyciu systemu do wizualizacji żeli Fusion Fx7 (Viber Lourant, USA), kamery CCD, a także oprogramowania Fusion software. Membrany naświetlano przez 10-30 sekund. Pomiary densytometryczne wykonano w programie komputerowym GelQuantNET, a uzyskane wyniki znormalizowano względem

β -aktyny. Wyniki przedstawiono jako różnicę poziomu syntezy badanego białka między próbami badanymi, a próbą kontrolną.

3.2.13. Analiza uszkodzeń DNA metodą TUNEL

Odczynniki:

- a) komercyjny zestaw DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, USA) o składzie:
 - bufor ekwilibracyjny,
 - mieszanina nukleotydów,
 - rekombinowany enzym rTdT (terminal deoxynucleotidyl transferase),
 - bufor 20x SSC,
 - proteinaza K,
- b) 4% paraformaldehyd (Sigma, Niemcy),
- c) 0.1% Triton X, 0.1% cytrynian sodu, PBS (Sigma, Niemcy),
- d) enzym DNase I (Promega, USA),
- e) barwnik DAPI (Kreatech, Belgia).

Wykonanie:

Analiza uszkodzeń DNA została wykonana z użyciem komercyjnie dostępnego testu DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System. Komórki wysiano na czarne płytki 96-dołkowe dedykowane do technik fluorescencyjnych w gęstości 3×10^3 komórek/cm² (powierzchnia dołka 0.32 cm²), a następnie umieszczono w inkubatorze

na 24h. Po tym czasie dodano nowe medium z lekami w odpowiednich stężeniach i inkubowano przez 48h i 96h. Następnie, komórki utrwalono w roztworze 4 % paraformaldehydu (20 min, RT) oraz wykonano kontrolę pozytywną poprzez trawienie enzymem DNazą I (3 U/ml w 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mg/ml BSA) (inkubacja 10 min, 37°C). Kolejno, dołki zostały przepłukane DPBS i pokryte mieszaniną do znakowania zawierającą rekombinowany enzym oraz mix nukleotydów (w buforze ekwilibracyjnym). Płytkę szczelnie zamknięto i umieszczono w komorze wilgotnej w temperaturze 37°C na 60 min. W ostatnim etapie dodano do każdego dołka barwnik DAPI w celu wizualizacji jąder komórkowych. Analiza została wykonana za pomocą cytometru obrazowego InCell Analyzer 2000 na dwóch kanałach (kanał niebieski –DAPI, zielony – FITC). Komórki TUNEL+ (pozytywne) przedstawiono jako % na tle wszystkich analizowanych komórek.

3.2.14. Ocena żywotności komórek za pomocą barwienia bromek etydyny/oranż akrydyny (EtBr/OA)

Odczynniki:

- a) roztwór bromku etydyny w stężeniu 100 µg/ml w PBS (Sigma, Niemcy),
- b) roztwór oranżu akrydyny w stężeniu 100 µg/ml w PBS (Sigma, Niemcy).

Wykonanie:

Komórki wysiano na 96-dołkowe płytki dedykowane do technik fluorescencyjnych w gęstości 3×10^3 komórek/cm² (powierzchnia dołka 0.32 cm²) i wstawiono do inkubatora na 24h. Następnie komórki poddano działaniu leków w odpowiednich stężeniach przez 48h i 96h. Po upływie czasu ekspozycji medium odciągnięto, a do każdego dołka dodano po 100 µl roztworu barwiącego (oranż akrydyny + bromek etydyny w medium DMEM w stosunku 1:50). Dokumentację zdjęć fluorescencyjnych wykonano bezpośrednio po barwieniu przyżyciowym komórek za pomocą cytometru obrazowego InCell Analyzer 2000 przy powiększeniu 10× na dwóch kanałach: czerwony-Texas Red i zielony-FITC. Wyniki podano jako żywotność komórek w %.

3.2.15. Ocena żywotności za pomocą zestawu Fluo Cell Double Staining Kit Calcein AM/PI

Odczynniki:

- a) Fluo Cell Double Staining Kit Calcein AM/PI (MoBiTec, Niemcy):
 - roztwór A: 1 mM Kalceina-AM w DMSO,
 - roztwór B: 1.5 mM jodek propidyny w H₂O,
- b) PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*) pH 7.4 (Biowest, Francja).

Wykonanie:

Komórki dwóch badanych linii zostały rutynowo wysiane na 96-dołkowe płytki dedykowane do technik fluorescencyjnych w gęstości 3×10^3 komórek/cm² (powierzchnia dołka 0.32 cm²). Po 24h inkubacji komórki poddano działaniu leków i pozostawiono na 48h i 96h ekspozycję. Po tym czasie wykonano procedurę oceny żywotności komórek (zgodnie z zaleceniami producenta). W pierwszym etapie sporządzono mieszaninę: 2.5 µl kalceiny-AM + 5 µl jodku propidyny (PI) w 5 ml PBS. Komórki na płytkach przepłukano w PBS, a następnie dodano po 50 µl mieszaniny barwiącej do każdego z dołków i inkubowano 15 min w 37°C. Kolejno, przeprowadzono detekcję sygnału z wykorzystaniem cytometru obrazowego In Cell Analyzer 2000 przy powiększeniu 10× i kanałach: czerwony-Texas Red i zielony-FITC. Wyniki podano jako żywotność komórek w %.

3.2.16. Lokalizacja receptora alfa-2-adrenergicznego oraz transportera serotoniny metodą immunohistochemiczną oraz immunofluorescencyjną

Odczynniki:

- a) 4 % bufor formalinowy (Chempur, Polska),
- b) absolutny alkohol etylowy (Chempur, Polska),
- c) ksylen (Chempur, Polska),
- d) paraplant (Sigma, Niemcy),

- e) albumina (BSA) (Sigma, Niemcy),
- f) APS (Sigma, Niemcy),
- g) bufor cytrynianowy 0.01 M; pH 6.0 (Chempur, Polska),
- h) bufor PBST (0.25 % Triton X-100) (Sigma, Niemcy),
- i) bufor blokujący: 1% BSA w PBST,
- j) zestaw DAKO Envision skoniugowany z HRP (polimer znakowany peroksydazą) (Dako, USA),
- k) medium zamykające DPX (Sigma, Polska),
- l) przeciwciało królicze poliklonalne α -alfa-2a (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:100,
- m) przeciwciało kozie poliklonalne α -SERT (Thermo Fisher Scientific, USA) 1:100,
- n) bufor utrwalający: 3.7 % formaldehyd + 0.1% Triton X-100 w buforze PBS,
- o) przeciwciało kozie poliklonalne α – królicze sprzężone z FITC (Thermo Scientific, USA) 1:1000,
- p) przeciwciało kozie poliklonalne α – królicze sprzężone z Texas Red (Thermo Scientific, USA) 1:1000,
- q) roztwór Hoechst 33258 w stężeniu 1 μ g/ml (Sigma, Niemcy),
- r) 1 % roztwór eozyny (Sigma, Niemcy),
- s) 1 % roztwór hematoksyliną (Sigma, Niemcy).

Wykonanie:

Metoda immunohistochemiczna oznaczania receptorów w tkankach jąder

Fragmety tkanki jąder szczura pobrano pośmiertnie (dzięki współpracy z Instytutem Farmakologii PAN w Krakowie), a następnie utrwalono według procedury przedstawionej w Tab. 3.2. Tak przygotowane preparaty zatopiono w bloczkach paraplastowych, pokrojono mikrotomem (Leica Wetzlar, USA) na skrawki o grubości 4 μ m i naniesiono na szkiełka podstawowe pokryte uprzednio warstwą APS.

Tab. 3.2. Schemat procedury zatapiania preparatów tkankowych.

Odczynnik	Czas inkubacji
4 % bufor formalinowy	24h
alkohol 50 %	24h
alkohol 70 %	24h
alkohol 96 %	24h
alkohol absolutny	1 h
alkohol absolutny	1 h
alkohol absolutny+ksylen	1h
ksylen I	20 min
ksylen II	20 min
paraplast I	12 h
paraplast II	24h

W kolejnym etapie, preparaty mikroskopowe tkanki jądra nawodniono poprzez przeprowadzenie przez szereg wodnych roztworów alkoholu etylowego o malejących stężeniach zgodnie z Tab. 3.3.

Tab. 3.3. Schemat procedury nawadniania preparatów mikroskopowych.

Odczynnik	Czas inkubacji
ksylen I	3 min
ksylen II	3 min
alkohol absolutny I	3 min
alkohol absolutny II	3 min
alkohol 96 % I	3 min
alkohol 96 % II	3 min
alkohol 70 %	3 min
alkohol 50 %	3 min
woda destylowana	3 min

Tak przygotowane preparaty (nawodnione i odparafinowane) wystawiono na działanie wysokiej temperatury w kuchence mikrofalowej (2 x po 3 min, 800 W) w buforze cytrynianowym o pH 6.0 celem odsłonięcia epitopów dla przeciwciał. Następnie szkiełka ostudzono, umieszczono w PBST w celu permabilizacji błon komórkowych (10 min, RT), a następnie w 1 % BSA w PBST w celu zablokowania niespecyficznego miejsc (30 min, RT). Dalej, na szkiełka naniesiono roztwór przeciwciał pierwszorzędowych i pozostawiono na całą noc inkubacji w 4°C w komorach wilgotnych. Kolejnego dnia preparaty odpłukano 3 x 2 min w PBST i nałożono po 100 µl polimeru znakowanego peroksydazą. Inkubację prowadzono w ciemności przez 30 min RT. Szkiełka ponownie odpłukano 2 x 1 min w PBST i naniesiono 100 µl substratu chromogenu. Stopień wybarwienia monitorowano na bieżąco, po czym reakcja została zatrzymana poprzez przepłukanie w wodzie destylowanej. Na koniec preparaty zostały zamknięte w medium DPX. Dokumentację fotograficzną wykonano za pomocą mikroskopu Olympus CX41 wyposażonego w oprogramowanie Motic Images Plus 3.0. Reakcję kontrolną wykonano według powyższej procedury z pominięciem etapu dodania przeciwciał pierwszorzędowych (zastąpione buforem blokującym).

Barwienie hematoksyliny/eozyny (HE) tkanek jąder

Preparaty mikroskopowe po nawodnieniu umieszczono w roztworze hamtoksyliny na 10 min, RT. Kolejno, nadmiar barwnika usunięto przez płukanie preparatów w wodzie destylowanej przez 10 min. Szkiełka przeniesiono do roztworu eozyny na 5 min i ponownie odpłukano w wodzie destylowanej przez 5 min. Preparaty poddano nawodnieniu, a następnie zamknięto w medium DPX. Dokumentację fotograficzną wykonano za pomocą mikroskopu Olympus CX41 wyposażonego w oprogramowanie Motic Images Plus 3.0.

Metoda immunofluorescencyjna oznaczania receptorów w liniach komórkowych

Lokalizację receptorów metodą immunofluorescencyjną wykonano na preparatach komórek utrwalonych na płytkach 96-dołkowych. W pierwszym etapie medium hodowlane usunięto i dodano 100 µl buforu utrwalającego na 20 min. Dalej,

dołki przepłukano 2 x PBS i 1 x PBST, a następnie blokowano przez 30 min w 1% BSA w PBST. Po inkubacji, zawartość dołków usunięto i dodano roztwór przeciwciał I-rzędowych (4°C, 12h). Dołki ponownie przepłukano 3 x PBST i wprowadzono przeciwciało II-rzędowe znakowane fluorescencyjnie (inkubacja 60 min, RT, w ciemności). Na koniec procedury płytki przepłukano w PBST, komórki zawieszono w roztworze Hoechst 33258 na 10 min, przepłukano 3 x PBS i pozostawiono w 100 µl PBS. Dokumentację zdjęć wykonano za pomocą cytometru obrazowego InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare, USA) z wykorzystaniem odpowiednich filtrów.

3.2.17. Analiza statystyczna i opracowanie wyników

Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z co najmniej trzech biologicznych powtórzeń oraz trzech niezależnych technicznie eksperymentów. Różnice statystyczne wyników oznaczono przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post testem Dunnett'a. Statystyczne zestawienie wyników oraz obliczenia przygotowano w programie GraphPad Prism ver. 6.0. Wartość $p < 0.05$ uznano za istotną statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) (* różnice w obrębie jednej grupy czasowej pomiędzy lekami a kontrolą, ^ różnice pomiędzy grupami czasowymi 48h i 96h). Graficzna prezentacja wyników oraz panele poglądowe dokumentacji fotograficznej zostały wykonane w programie Adobe Photoshop ver. CC i nie zostały poddane jakimkolwiek modyfikacjom graficznym.

4. Wyniki

4.1. Lokalizacja receptorów alfa-2-adrenergicznych oraz transporterów białkowych serotoniny w preparatach histologicznych jąder szczura oraz komórkach spermatocytów badanych linii komórkowych *in vitro*

Jednym z pierwszych etapów prowadzonych badań było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy w komórkach spermatocytów znajdują się receptory dla działania leków przeciwdepresyjnych wybranych do dalszych badań, czyli receptory alfa-2-adrenergiczne (alfa-2a) oraz transportery białkowe serotoniny (SERT). Dzięki współpracy z Instytutem Farmakologii PAN w Krakowie możliwe było uzyskanie materiału tkanek jąder szczura bez konieczności ponoszenia dodatkowych nakładów finansowych. Zwierzęta kontrolne, nie poddane działaniu leków przeciwdepresyjnych, zostały dekapitowane, a z pobranego materiału sporządzono preparaty mikroskopowe.

Barwienie podstawowe hematoksyliną i eozyną (HE) umożliwiło nam potwierdzenie prawidłowej budowy histologicznej tkanek jądra oraz kanalików nasiennych. Z kolei, zastosowanie metody immunohistochemicznej pozwoliło na wykazanie obecności zarówno receptorów alfa-2a jak również transporterów serotoniny (SERT) w analizowanych tkankach. Co więcej, zastosowana technika potwierdza błonową lokalizację receptora alfa-2a oraz podobnie receptora SERT (Fig. 4.1.).

W kolejnym etapie, potwierdzono z wykorzystaniem metody immunofluorescencyjnej lokalizację badanych receptorów alfa-2a oraz transporterów serotoniny w komórkach spermatocytów *in vitro* badanych linii komórkowych (Fig. 4.2.).

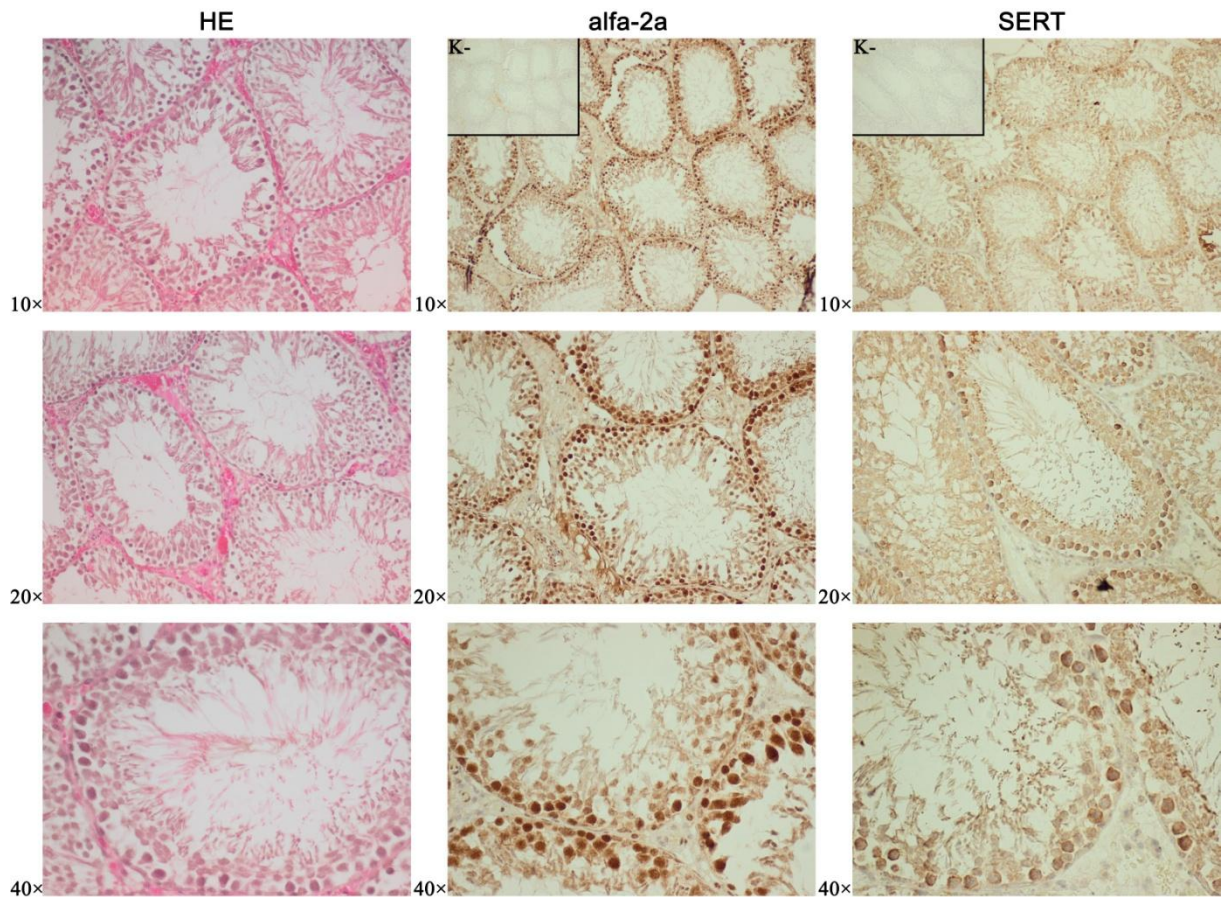


Fig. 4.1. Immunohistochemiczna lokalizacja receptorów alfa-2-adrenergicznych (alfa-2a) oraz transporterów białkowych serotoniny (SERT) w preparatach histologicznych tkanek jądra szczura. Reprezentatywne zdjęcia barwienia hematoksyliną i eozyną (HE) oraz immunohistochemicznego. Powiększenie obiektywów 10×, 20×, 40×. K. – kontrole negatywne bez użycia przeciwciała pierwszorzędowego.

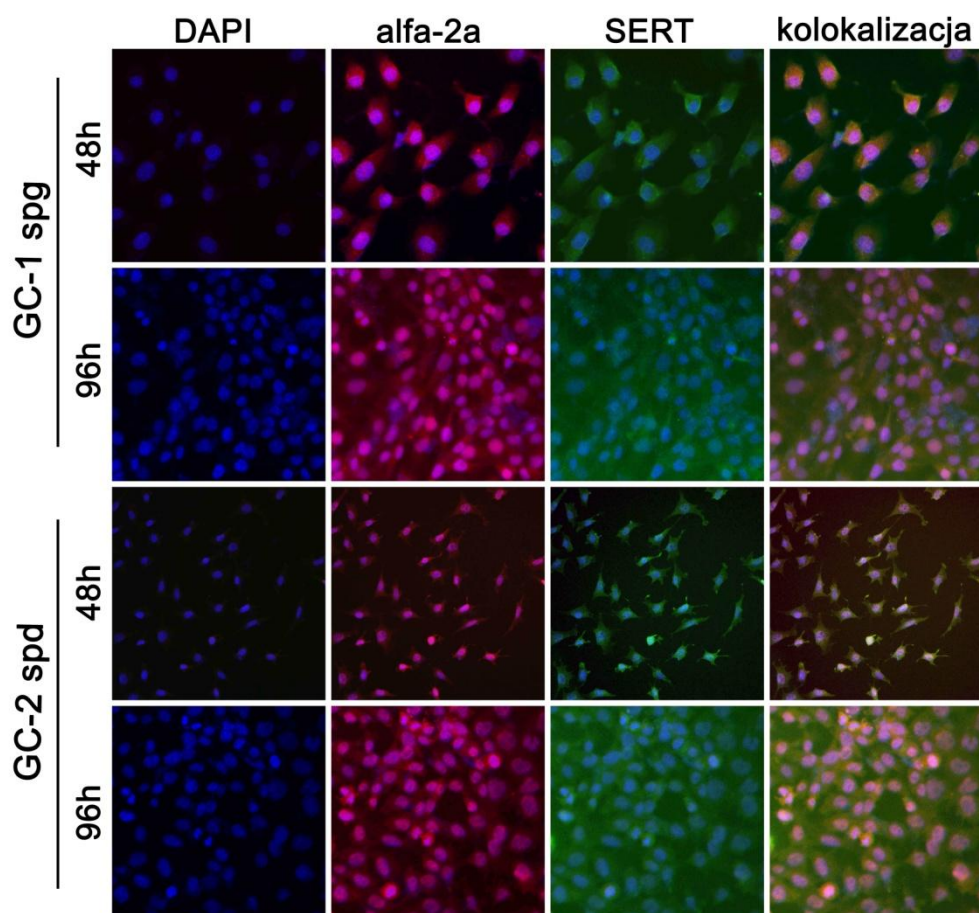


Fig. 4.2. Immunofluorescencyjna kolokalizacja receptorów alfa-2-adrenergicznych (alfa-2a) oraz transporterów białkowych serotoniny (SERT) w preparatach komórek spermatocytów badanych linii komórkowych (GC-1 spg oraz GC-2 spd) po 48 i 96-godzinnej hodowli w warunkach kontrolnych. Reprezentatywne zdjęcia barwienia: niebieska fluorescencja – Hoechst 33258 (jądra komórkowe), zielona – FITC (SERT), czerwona – Texas Red (alfa-2a). Powiększenie obiektywu 10×.

4.2. Wybór stężeń leków przeciwdepresyjnych do dalszych badań

Analiza kilku czasów inkubacji komórek spermatocytów linii komórkowych GC-1 spg oraz GC-2 spd w obecności szerokiego zakresu stężeń badanych leków przeciwdepresyjnych umożliwiła nam wybór konkretnych dawek badanych leków do dalszych badań. Na podstawie testu MTT (dla każdego leku niezależnie) wybrano takie stężenia, które powodują zahamowanie aktywności metabolicznej oraz potencjału proliferacyjnego badanych komórek do około 50 % po 96h ekspozycji na leki. Dla obu badanych linii komórkowych było to takie samo stężenie pojedynczych leków, co ułatwiło w znacznym stopniu późniejsze prawidłowe określenie różnic w mechanizmach odpowiedzi badanych komórek na stres.

W przypadku wszystkich leków, zaobserwowaliśmy zależny od dawki spadek aktywności metabolicznej komórek w szerokim zakresie badanych stężeń. Efekt ten był bezpośrednio związany ze wzrostem czasu inkubacji z lekami. Odnotowane rezultaty były spójne dla obu badanych linii komórkowych. Na podstawie uzyskanych wyników, zdecydowaliśmy się na wykorzystanie następujących dawek do wszystkich dalszych eksperymentów (na figurach oznaczone czerwonymi kółkami): AMI = 10 μ M (Fig. 4.3. a-b), ESC = 30 μ M (Fig. 4.4. a-b), FLU = 5 μ M (Fig. 4.5. a-b), IMI = 20 μ M (Fig. 4.6. a-b), MIR = 150 μ M (Fig. 4.7. a-b), OLZ = 40 μ M (Fig. 4.8. a-b), REB = 30 μ M (Fig. 4.9. a-b), VEN = 250 μ M (Fig. 4.10. a-b).

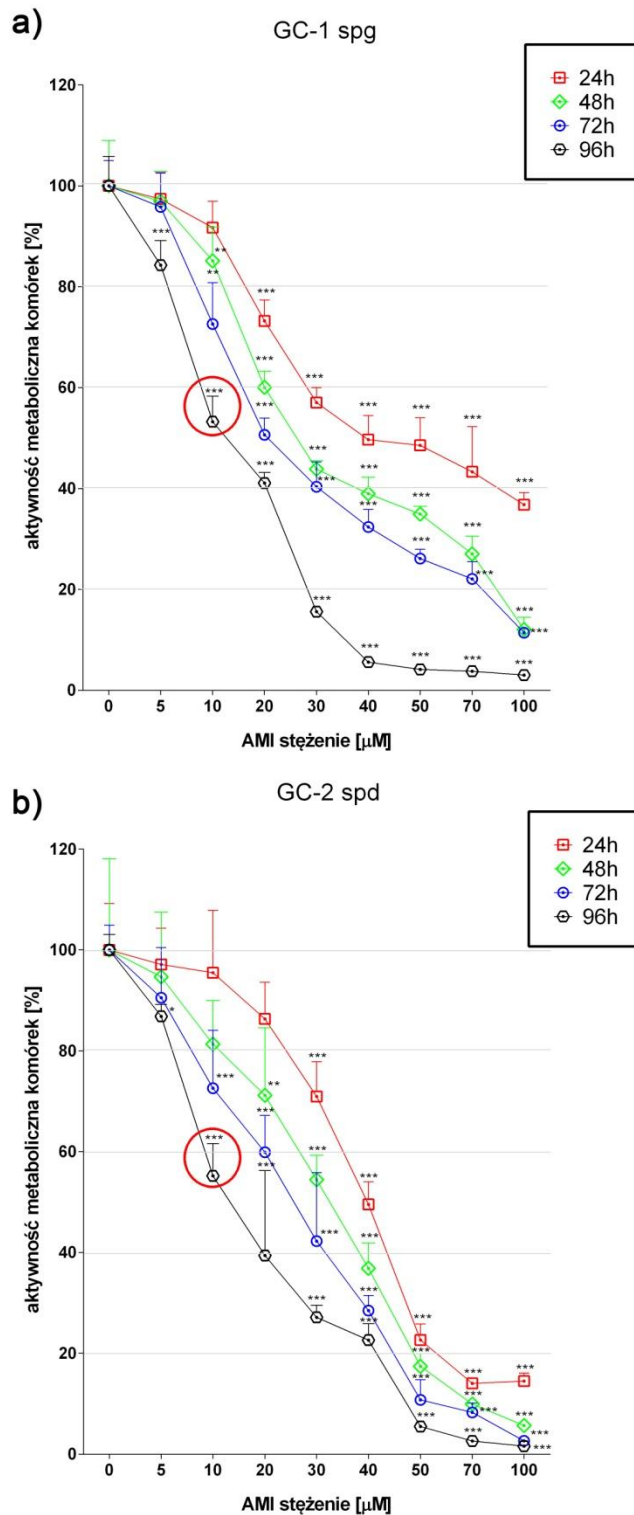


Fig. 4.3. Aktywność metaboliczna komórek linii GC-1 spg (a) oraz GC-2 spd (b) poddanych działaniu amitryptyliny w zakresie stężeń 5-100 μM oraz czasem inkubacji 24, 48, 72 i 96h. Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

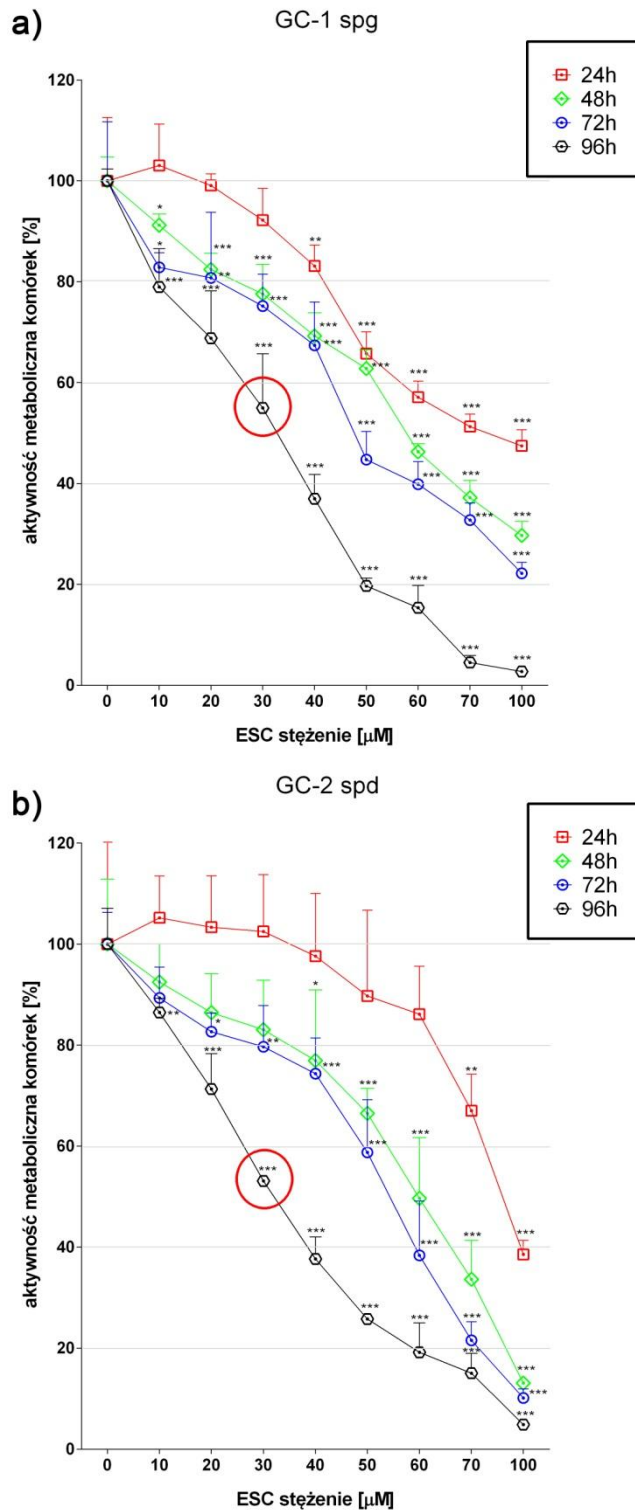


Fig. 4.4. Aktywność metaboliczna komórek linii GC-1 spg (a) oraz GC-2 spd (b) poddanych działaniu escitalopramu w zakresie stężeń 10-100 μM oraz czasem inkubacji 24, 48, 72 i 96h. Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

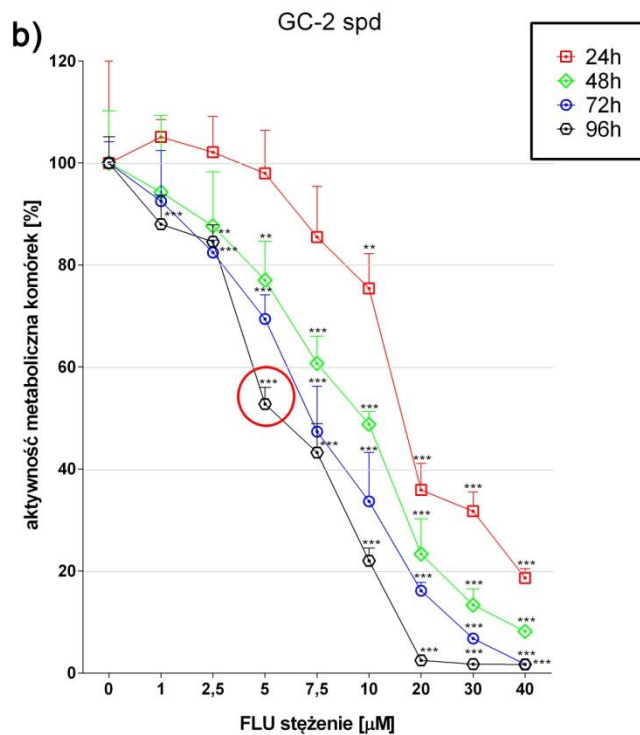
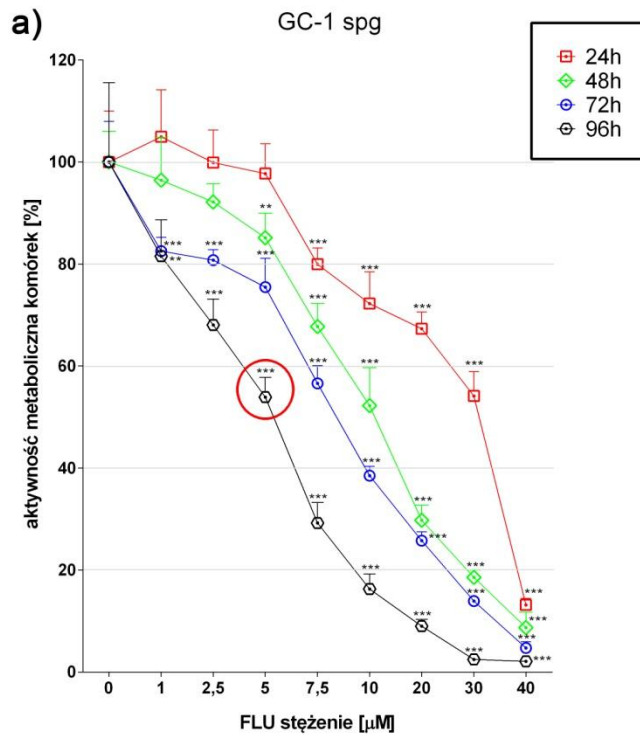


Fig. 4.5. Aktywność metaboliczna komórek linii GC-1 spg (a) oraz GC-2 spd (b) poddanych działaniu fluoksetyny w zakresie stężeń 1-40 μM oraz czasem inkubacji 24, 48, 72 i 96h. Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

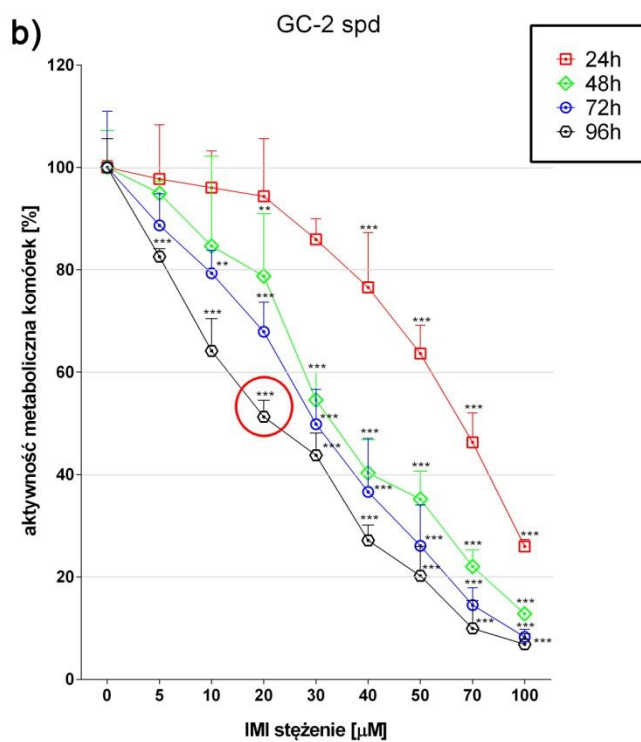
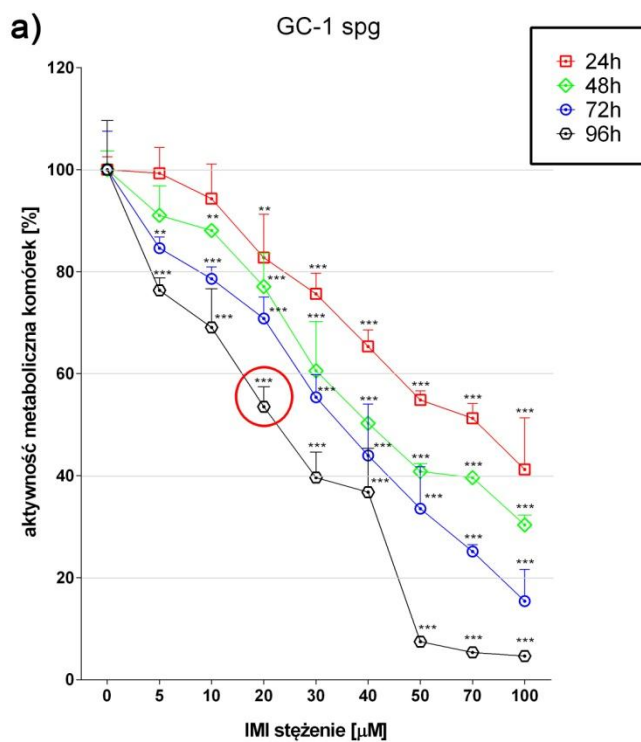


Fig. 4.6. Aktywność metaboliczna komórek linii GC-1 spg (a) oraz GC-2 spd (b) poddanych działaniu imipraminy w zakresie stężeń 5-100 μM oraz czasem inkubacji 24, 48, 72 i 96h. Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

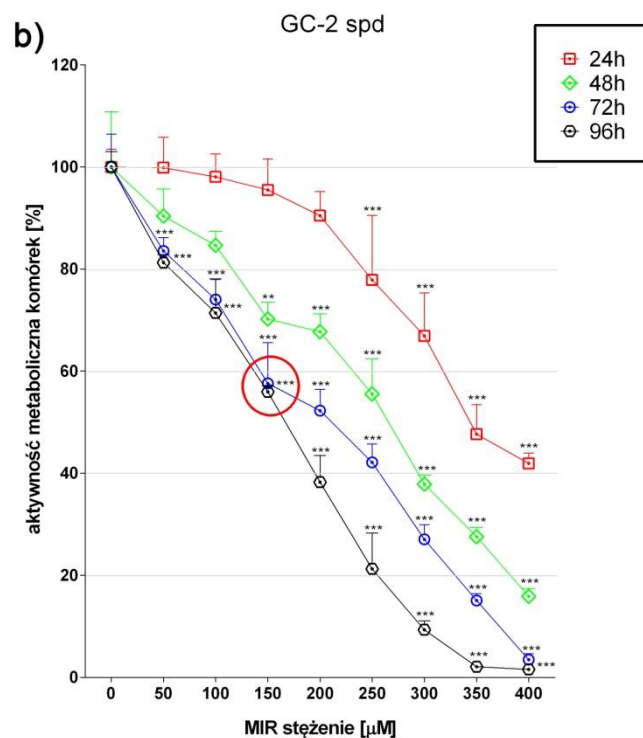
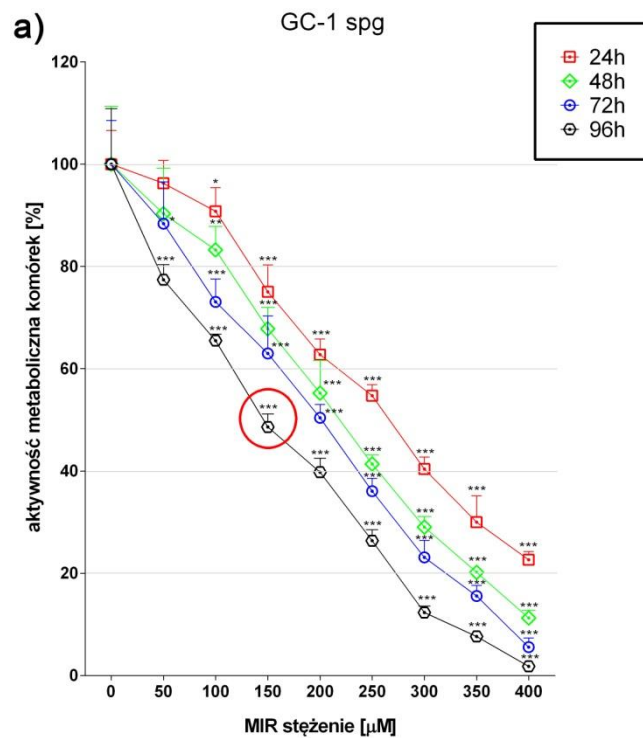


Fig. 4.7. Aktywność metaboliczna komórek linii GC-1 spg (a) oraz GC-2 spd (b) poddanych działaniu mirtazapiny w zakresie stężeń 50-400 μM oraz czasem inkubacji 24, 48, 72 i 96h. Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

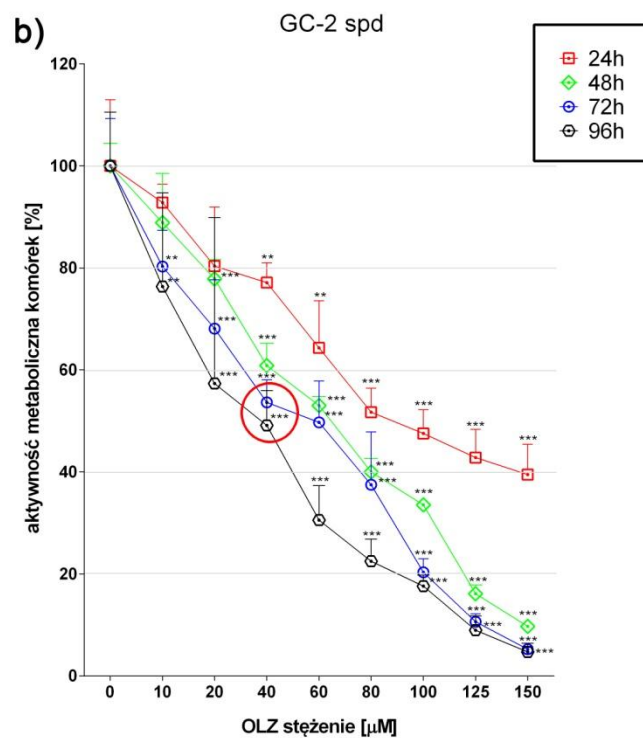
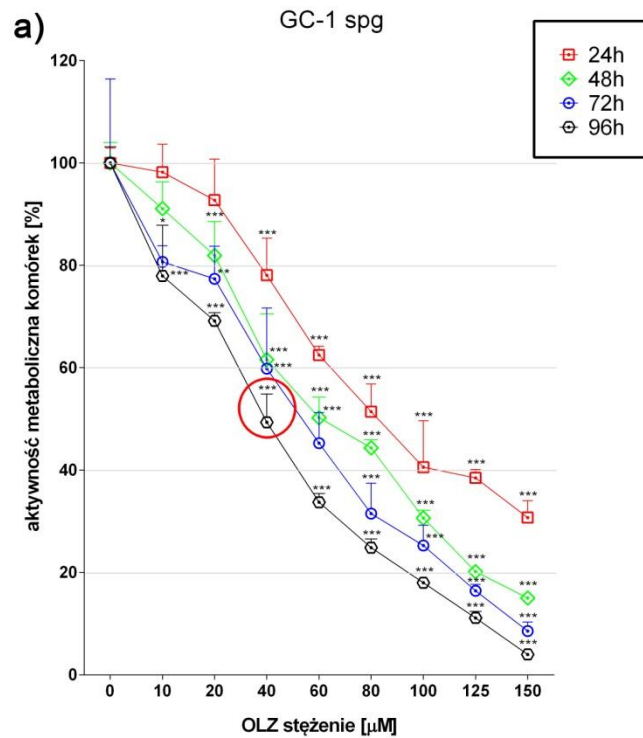


Fig. 4.8. Aktywność metaboliczna komórek linii GC-1 spg (a) oraz GC-2 spd (b) poddanych działaniu olanzapiny w zakresie stężeń 10-150 μM oraz czasem inkubacji 24, 48, 72 i 96h. Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

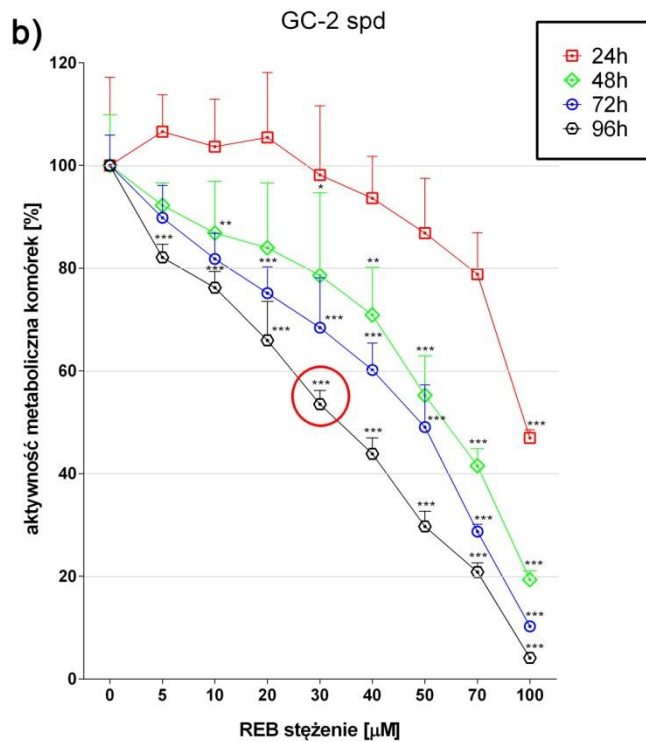
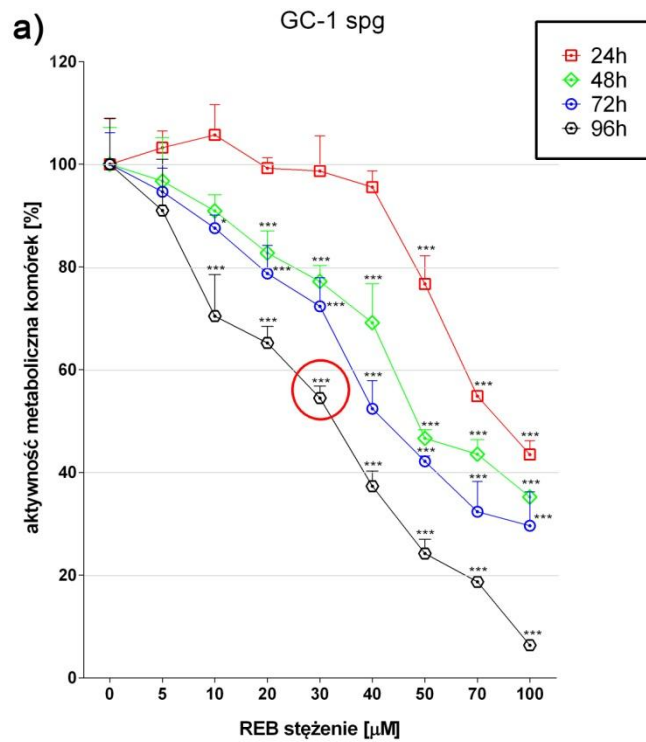


Fig. 4.9. Aktywność metaboliczna komórek linii GC-1 spg (a) oraz GC-2 spd (b) poddanych działaniu reboksetyny w zakresie stężeń 5-100 μM oraz czasem inkubacji 24, 48, 72 i 96h. Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

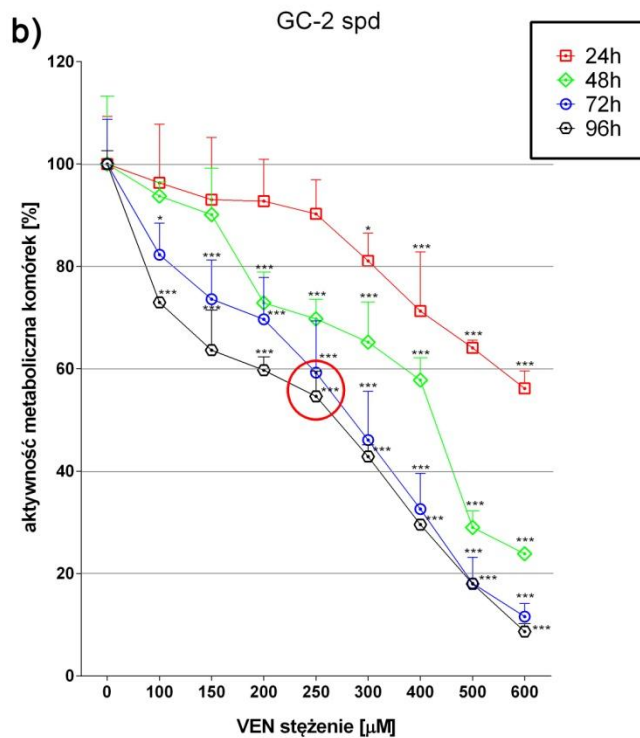
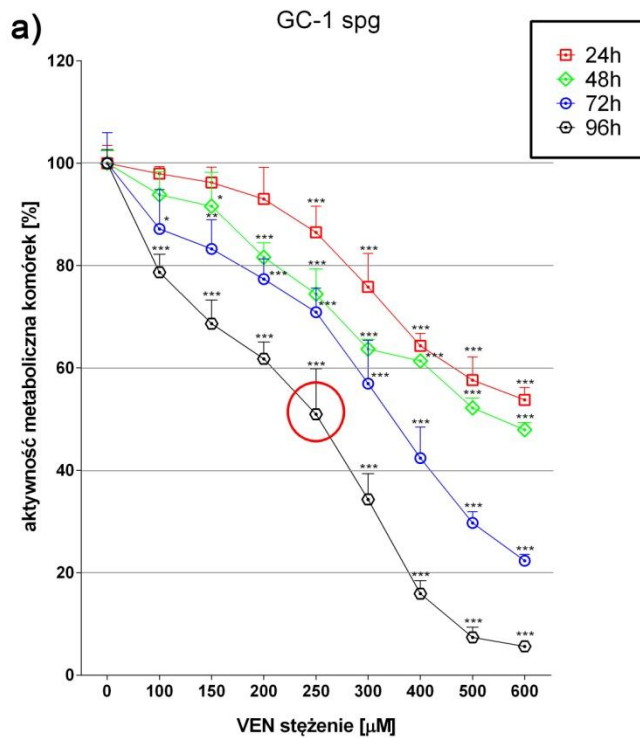


Fig. 4.10. Aktywność metaboliczna komórek linii GC-1 spg (a) oraz GC-2 spd (b) poddanych działaniu wenlafaksyny w zakresie stężeń 100-600 μM oraz czasem inkubacji 24, 48, 72 i 96h. Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.3. Ocena profilu generowanych reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) oraz stopnia redukcji glutationu

W kolejnym etapie badań dokonaliśmy oceny równowagi redoks w komórkach spermatocytów poddanych działaniu wybranych dawek leków przeciwdepresyjnych. Wynika to z faktu, iż jedną z przyczyn obserwowanych spadków aktywności metabolicznej może być zachwianie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej oraz upośledzenie mechanizmów zwalczających wolne rodniki. Z tego powodu sprawdziliśmy poziom produkcji RFT, RFA i stopień redukcji glutationu w komórkach spermatocytów. Do badań wykorzystano trzy sondy fluorescencyjne: DAF-FM do pomiaru pochodnych nadtlenu, dihydroetydynę do pomiaru ilości anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) oraz thiol tracker violet do pomiaru ilości wolnych tioli. Poziom fluorescencji każdej z sond jest wprost proporcjonalny do ilości powstających RFT, RFA, tioli.

Uzyskane wyniki potwierdzają wzrost produkcji RFT i RFA po 48h inkubacji z wyłączeniem RFT dla FLU i OLZ (linia GC-1 spg i GC-2 spd) oraz RFA dla MIR (linia GC-1 spg) (Fig. 4.11; Fig. 4.13; Fig. 4.15; Fig. 4.17.). Obserwowany efekt był jeszcze bardziej zauważalny po 96h ekspozycji w przypadku wszystkich układów eksperymentalnych w porównaniu z grupą kontrolą (Fig. 4.12; Fig. 4.14; Fig. 4.16; Fig. 4.18.) świadcząc jednoznacznie o inicjacji stresu oksydacyjnego oraz nitrozacyjnego, które z kolei mogą negatywnie wpływać na struktury komórkowe. Co interesujące, linia komórek GC-2 spd charakteryzowała się wyższym poziomem względnej wartości fluorescencji w porównaniu do linii GC-1 spg.

Kolejno, sprawdziliśmy czy utrzymujący się stres powoduje uruchomienie mechanizmów zmiatających wolne rodniki. W tym celu dokonaliśmy oceny stopnia redukcji glutationu jako wewnątrzkomórkowego mechanizmu enzymatycznej ochrony komórek odpowiedzialnego między innymi za neutralizację nadtlenu wodoru. Co interesujące, odnotowaliśmy aktywację tego mechanizmu po 48h i 96h ekspozycji na leki przeciwdepresyjne. W przypadku komórek linii GC-1 spg najniższy poziom zaobserwowano dla ESC, MIR, OLZ (48h) oraz OLZ (96h). Z kolei w przypadku komórek linii GC-2 spd dla MIR, VEN (48h) oraz OLZ (96h) (Fig. 4.19.-4.22.).

Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godzinną, a 96-godzinną inkubacją z lekami przeciwdepresyjnymi dla wszystkich 3 parametrów podano poniżej w Tab. 4.1.

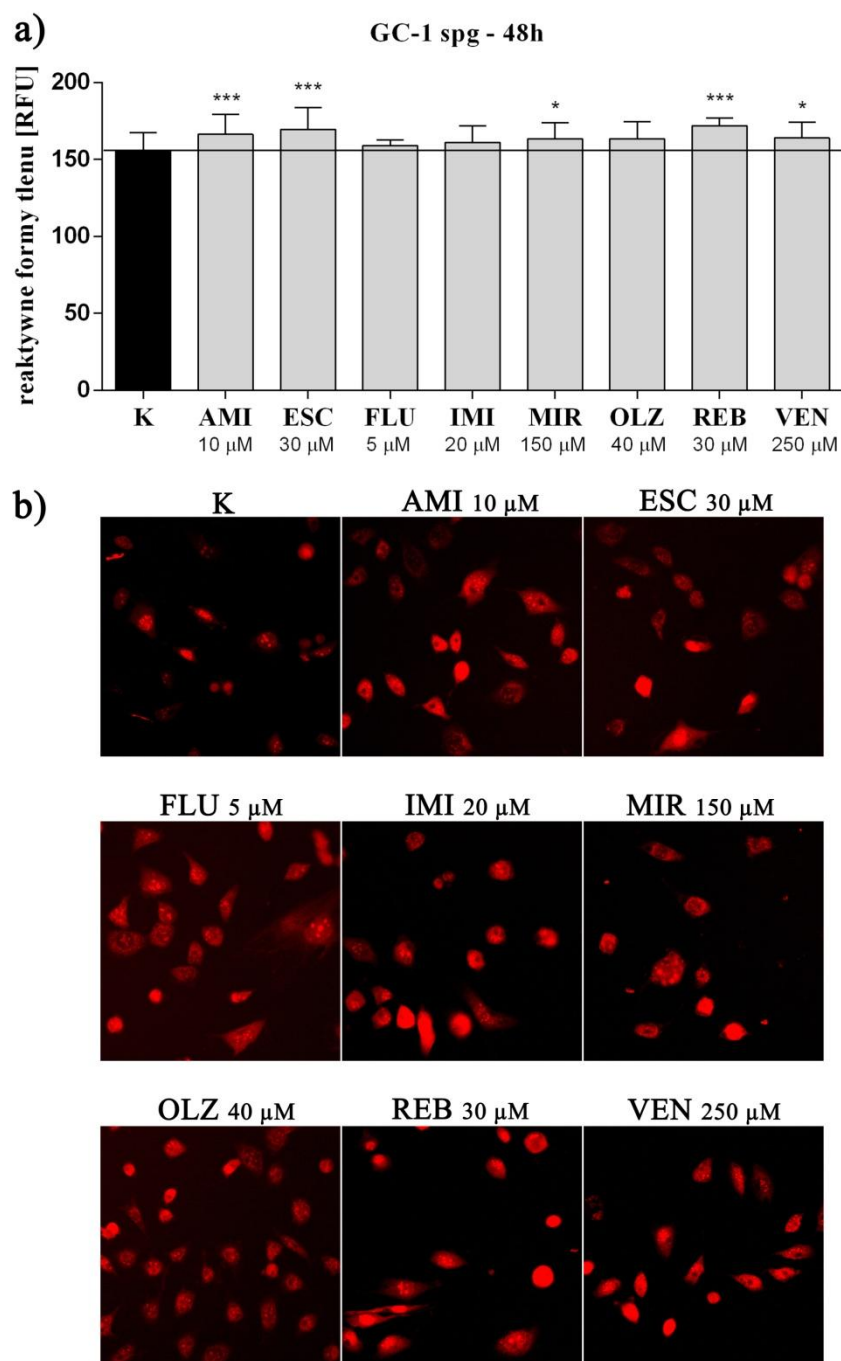


Fig. 4.11. Reaktywne formy tlenu (RFT) produkowane przez komórki linii GC-1 spg po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom RFT generowany przez komórki GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times).

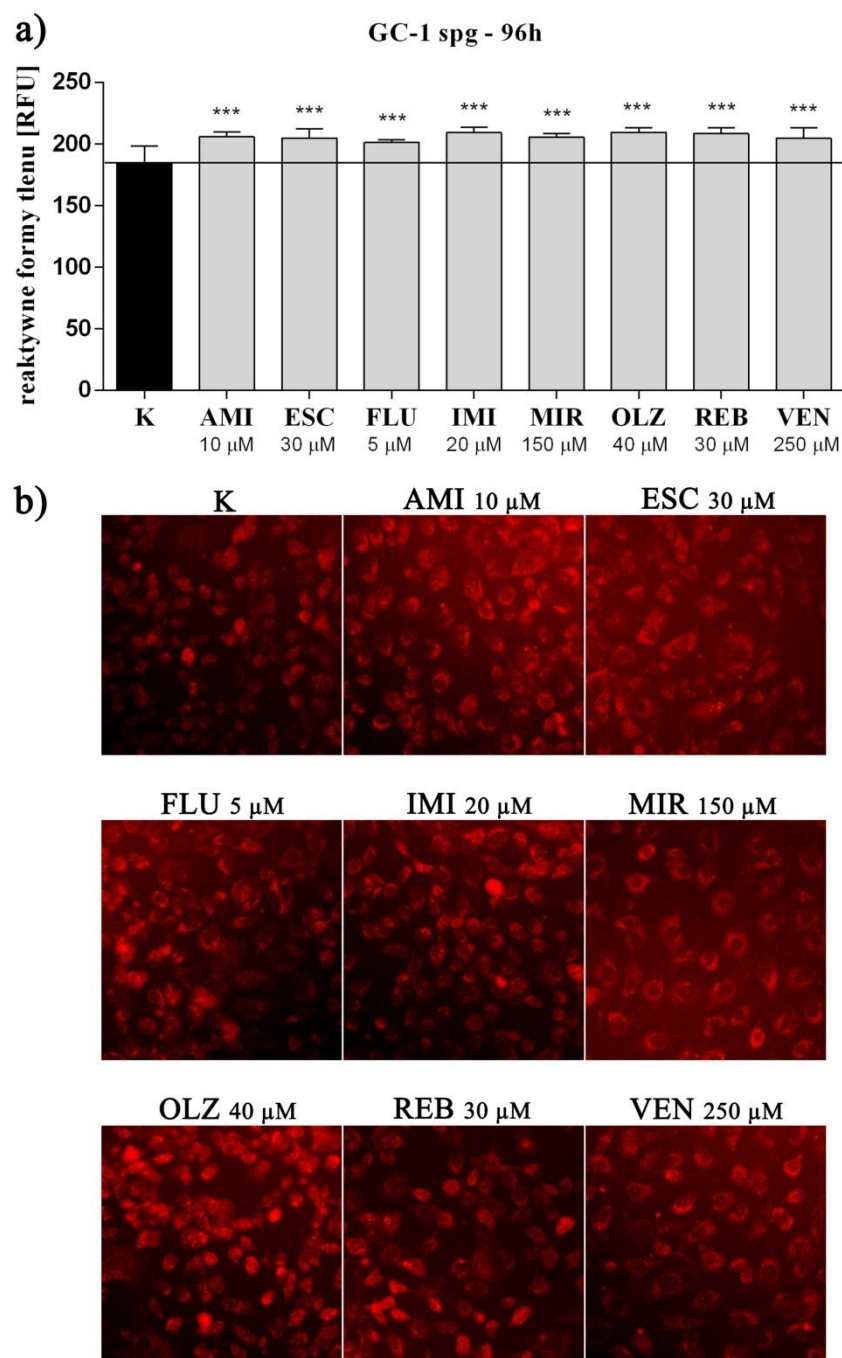


Fig. 4.12. Reaktywne formy tlenu (RFT) produkowane przez komórki linii GC-1 spg po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (***) $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom RFT generowany przez komórki GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times).

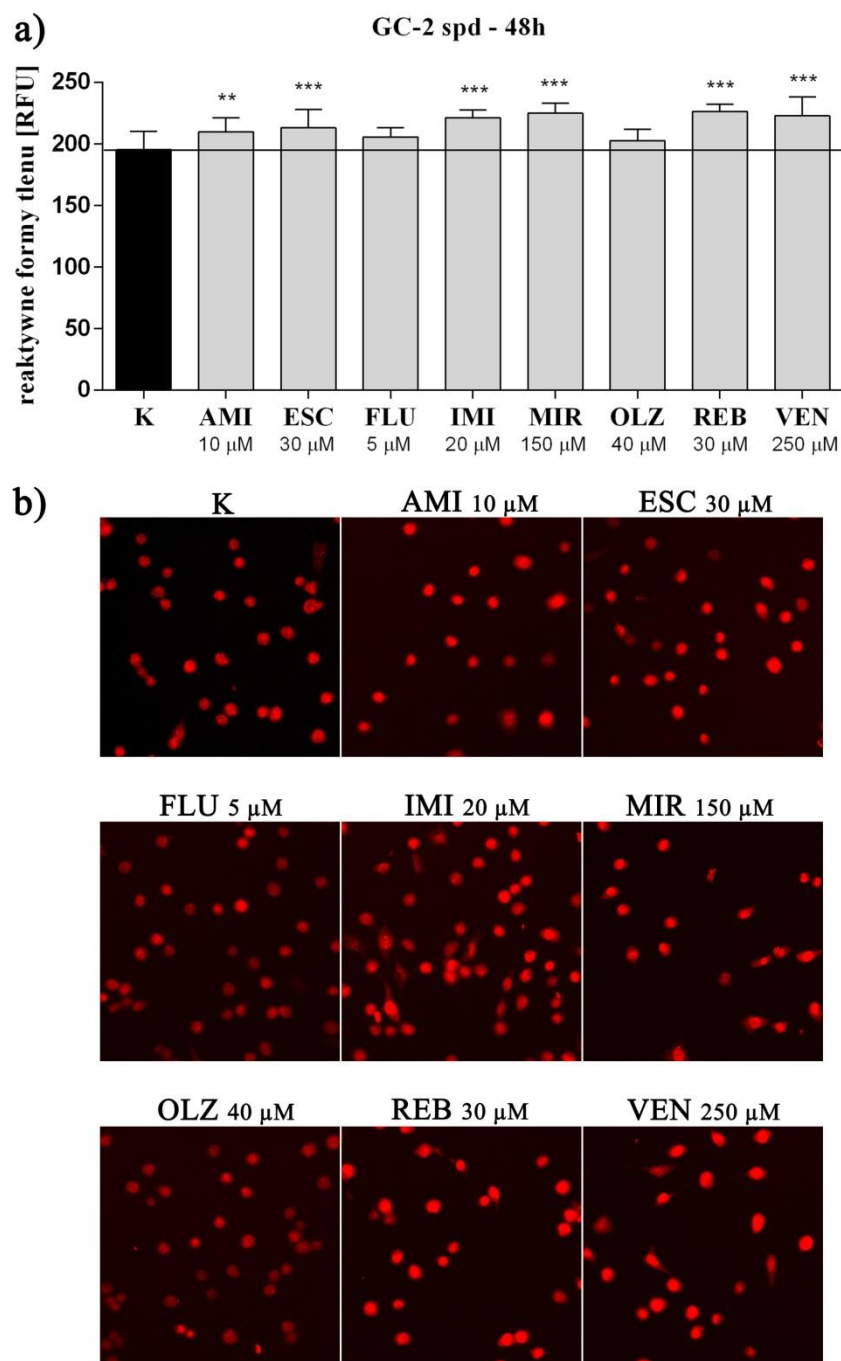


Fig. 4.13. Reaktywne formy tlenu (RFT) produkowane przez komórki linii GC-2 spd po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom RFT generowany przez komórki GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times).

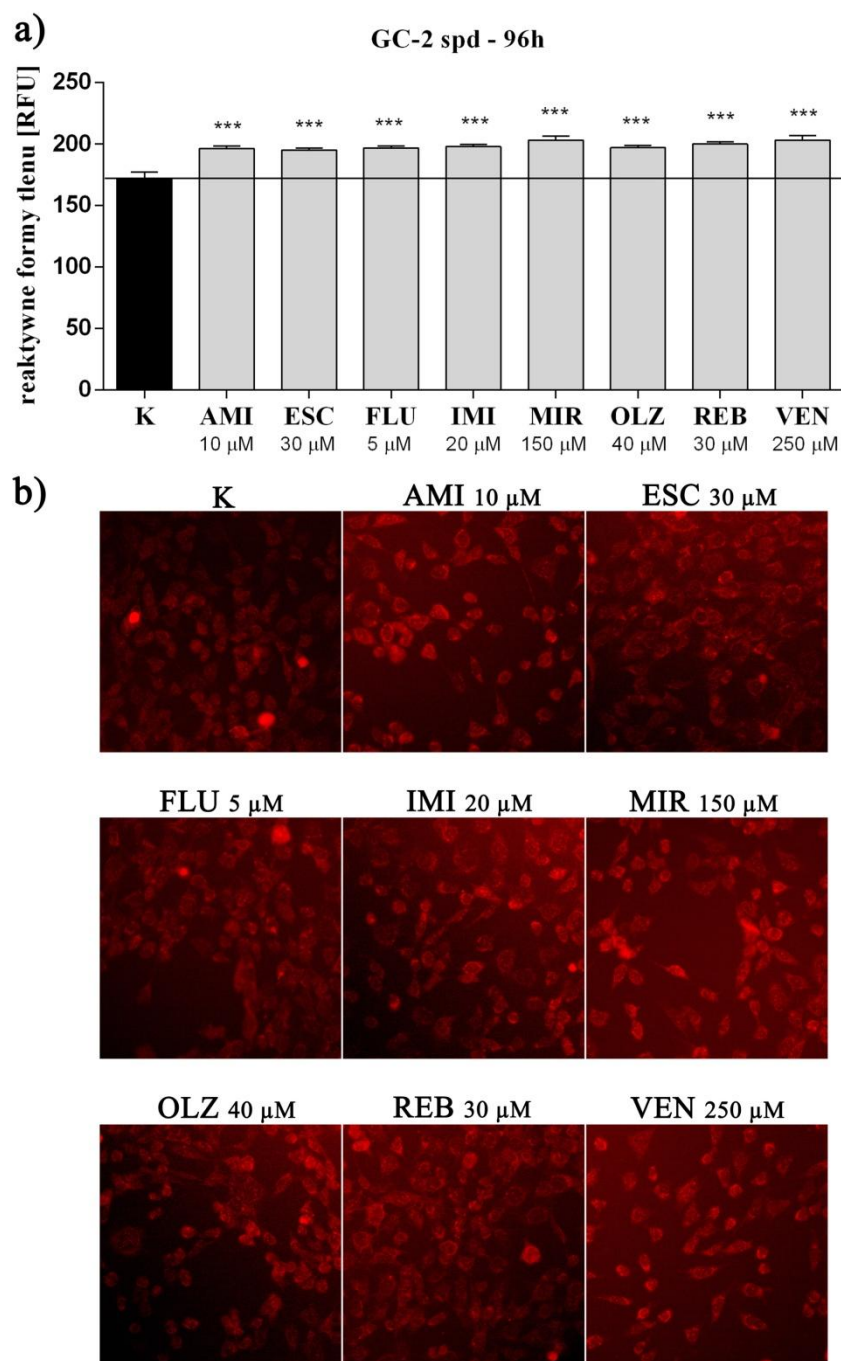


Fig. 4.14. Reaktywne formy tlenu (RFT) produkowane przez komórki linii GC-2 spd po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (***) $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom RFT generowany przez komórki GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times).

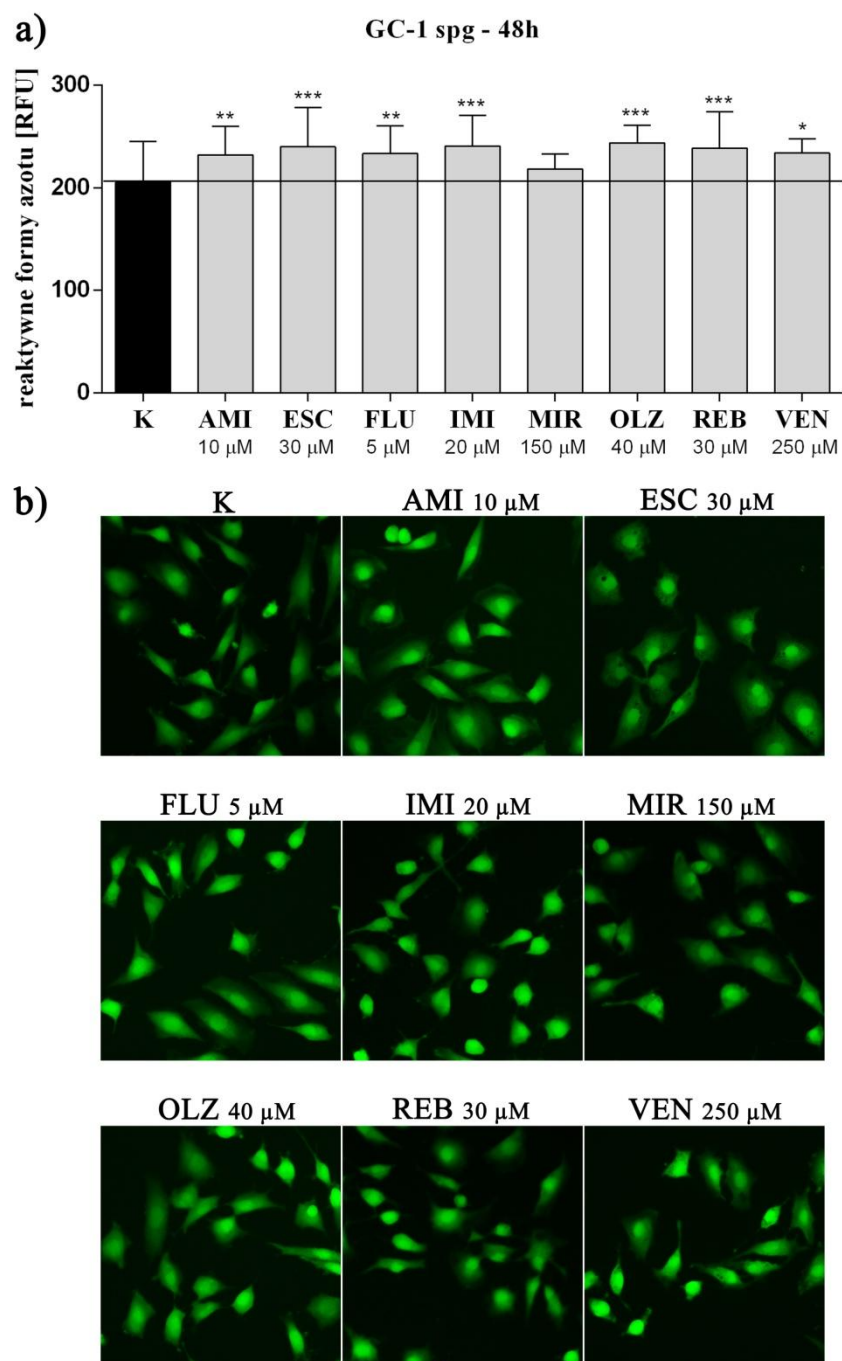


Fig. 4.15. Reaktywne formy azotu (RFA) produkowane przez komórki linii GC-1 spg po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $\bar{X} \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom RFA generowany przez komórki GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times).

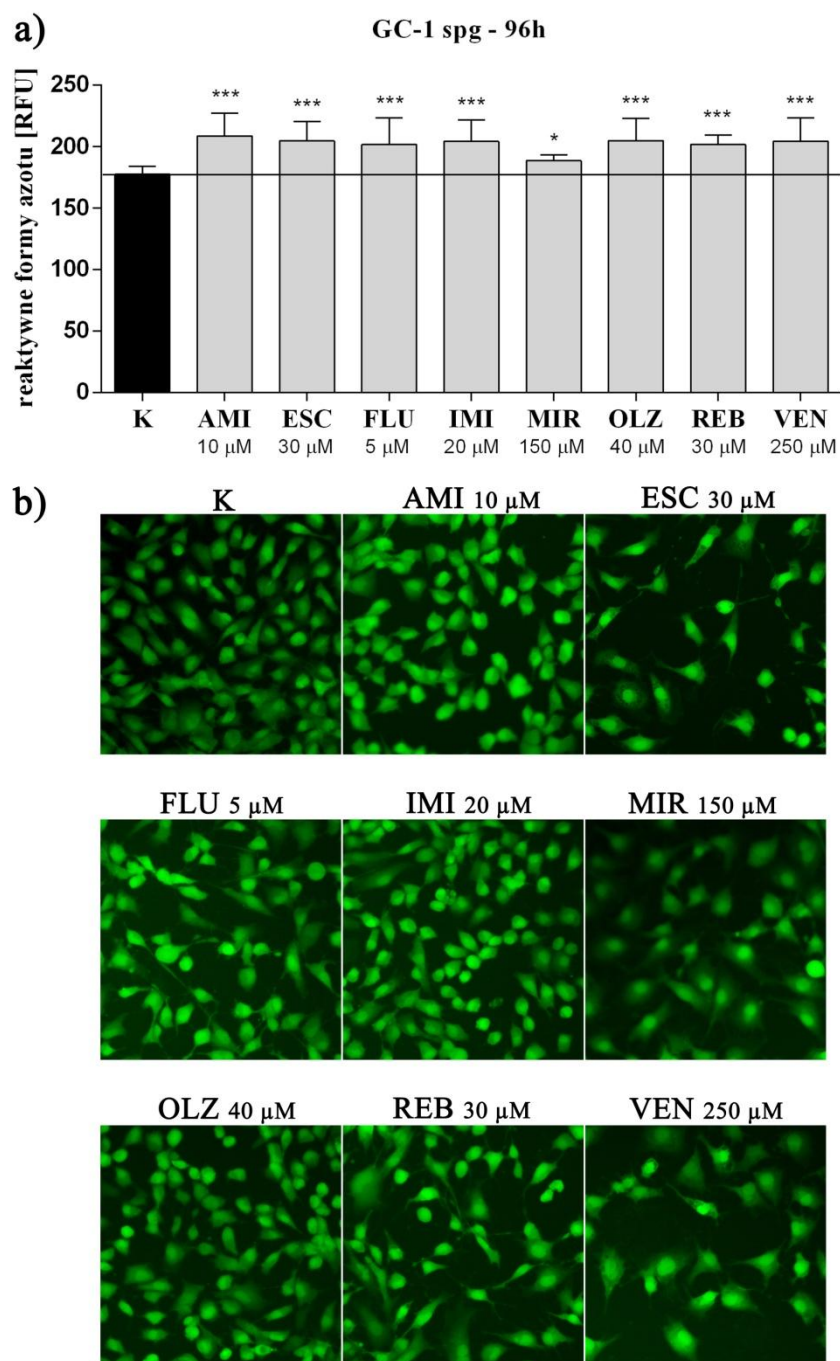


Fig. 4.16. Reaktywne formy azotu (RFA) produkowane przez komórki linii GC-1 spg po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom RFA generowany przez komórki GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times).

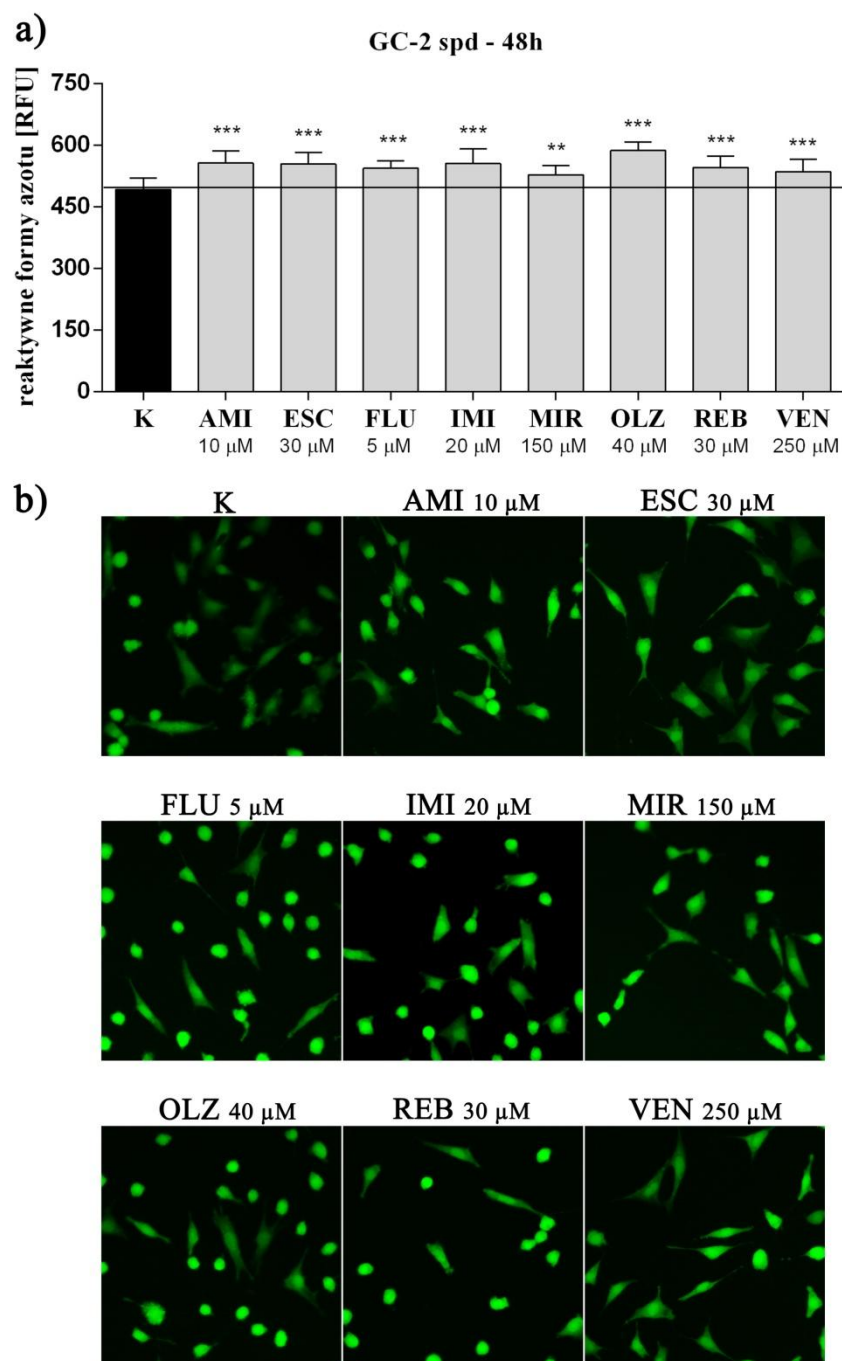


Fig. 4.17. Reaktywne formy azotu (RFA) produkowane przez komórki linii GC-2 spd po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom RFA generowany przez komórki GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times).

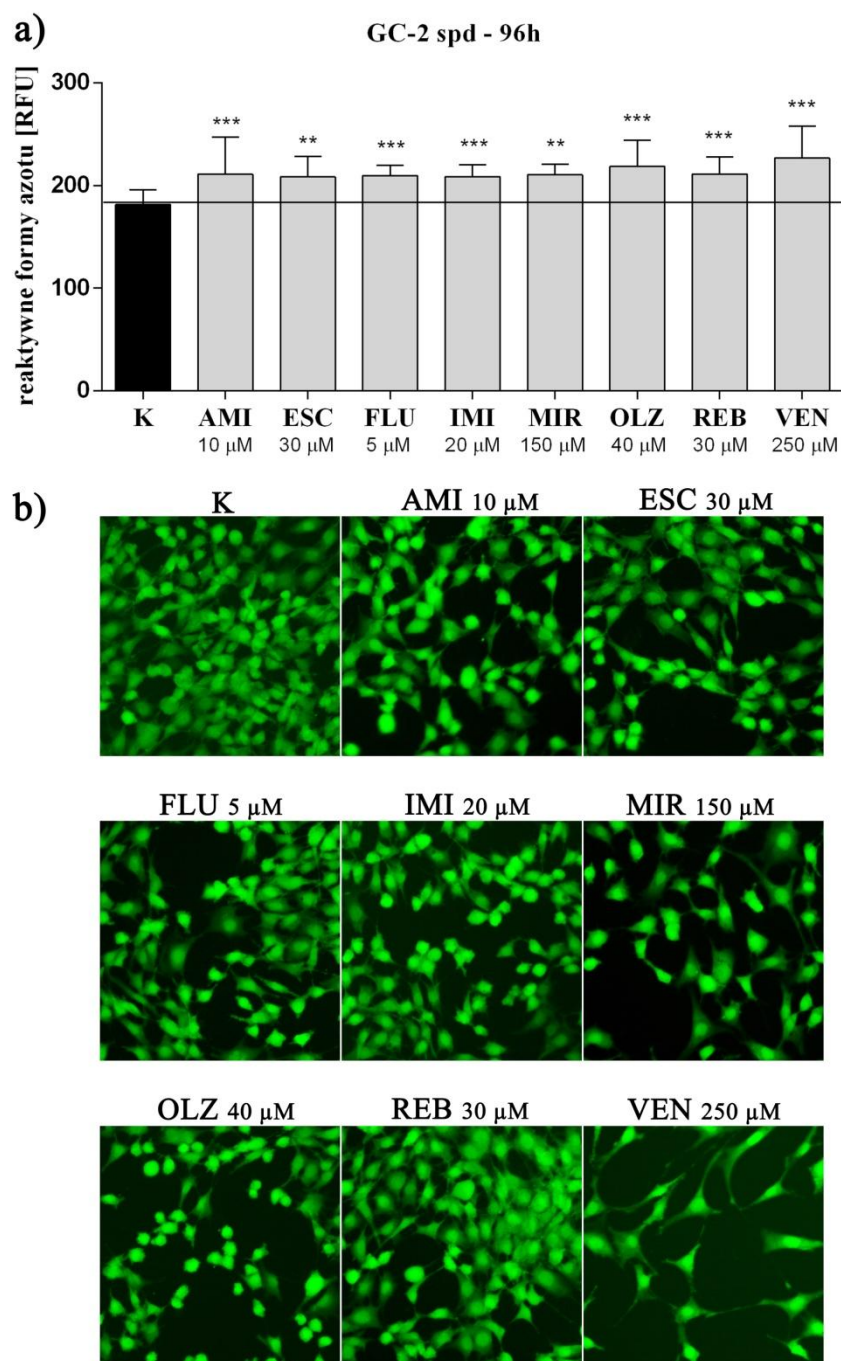


Fig. 4.18. Reaktywne formy azotu (RFA) produkowane przez komórki linii GC-2 spd po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom RFA generowany przez komórki GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times).

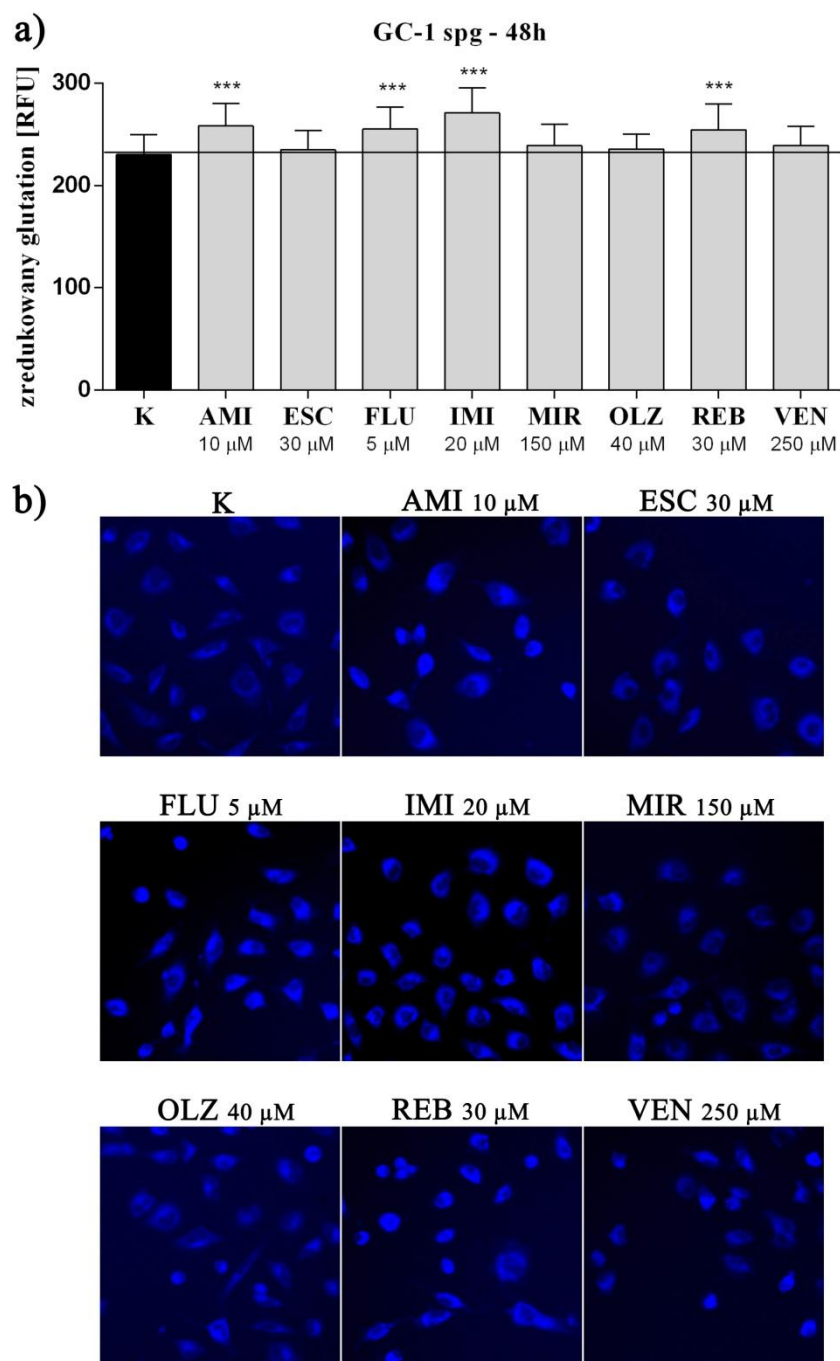


Fig. 4.19. Aktywacja mechanizmu redukcji glutationu przez komórki linii GC-1 spg po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (***) $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom zredukowanego glutationu w komórkach GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times).

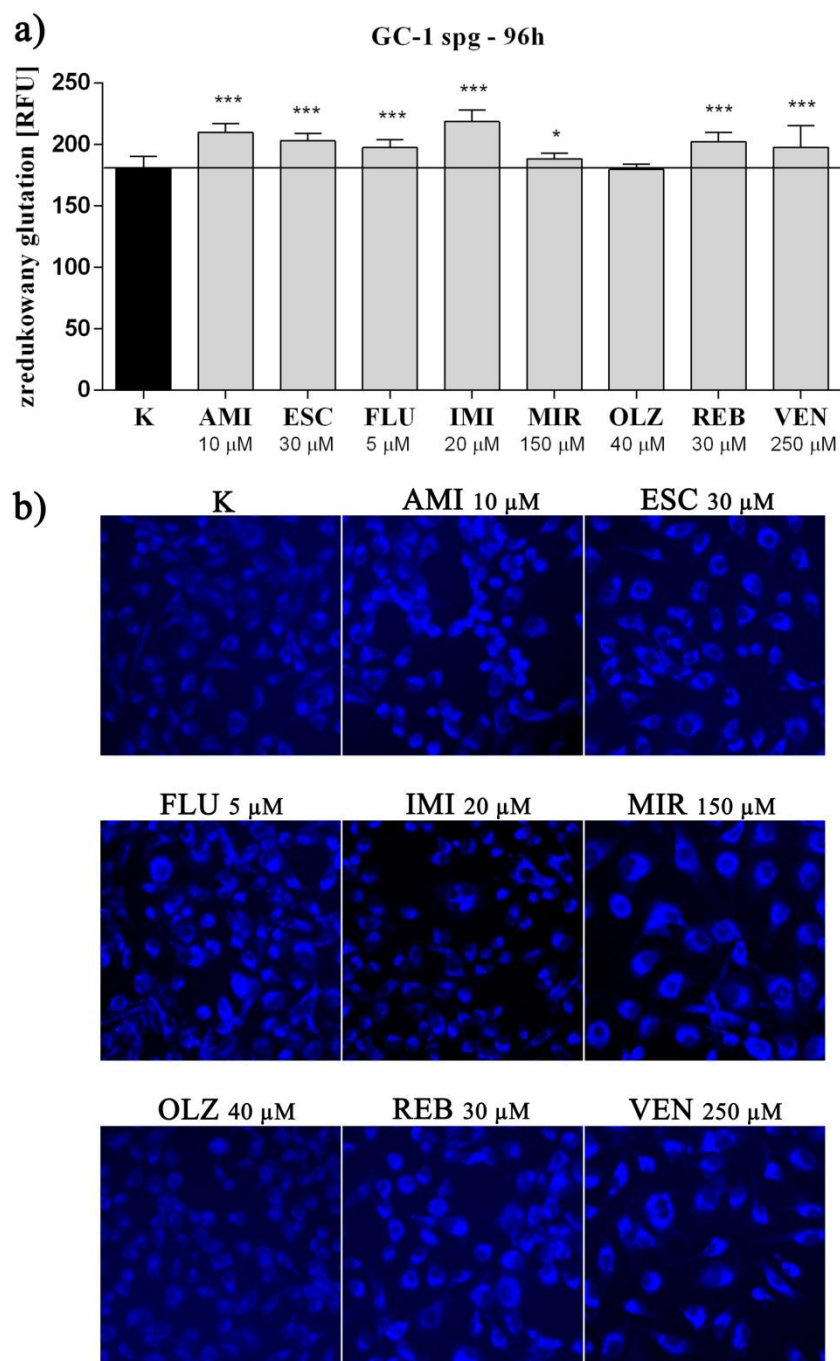


Fig. 4.20. Aktywacja mechanizmu redukcji glutationu przez komórki linii GC-1 spg po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom zredukowanego glutationu w komórkach GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times).

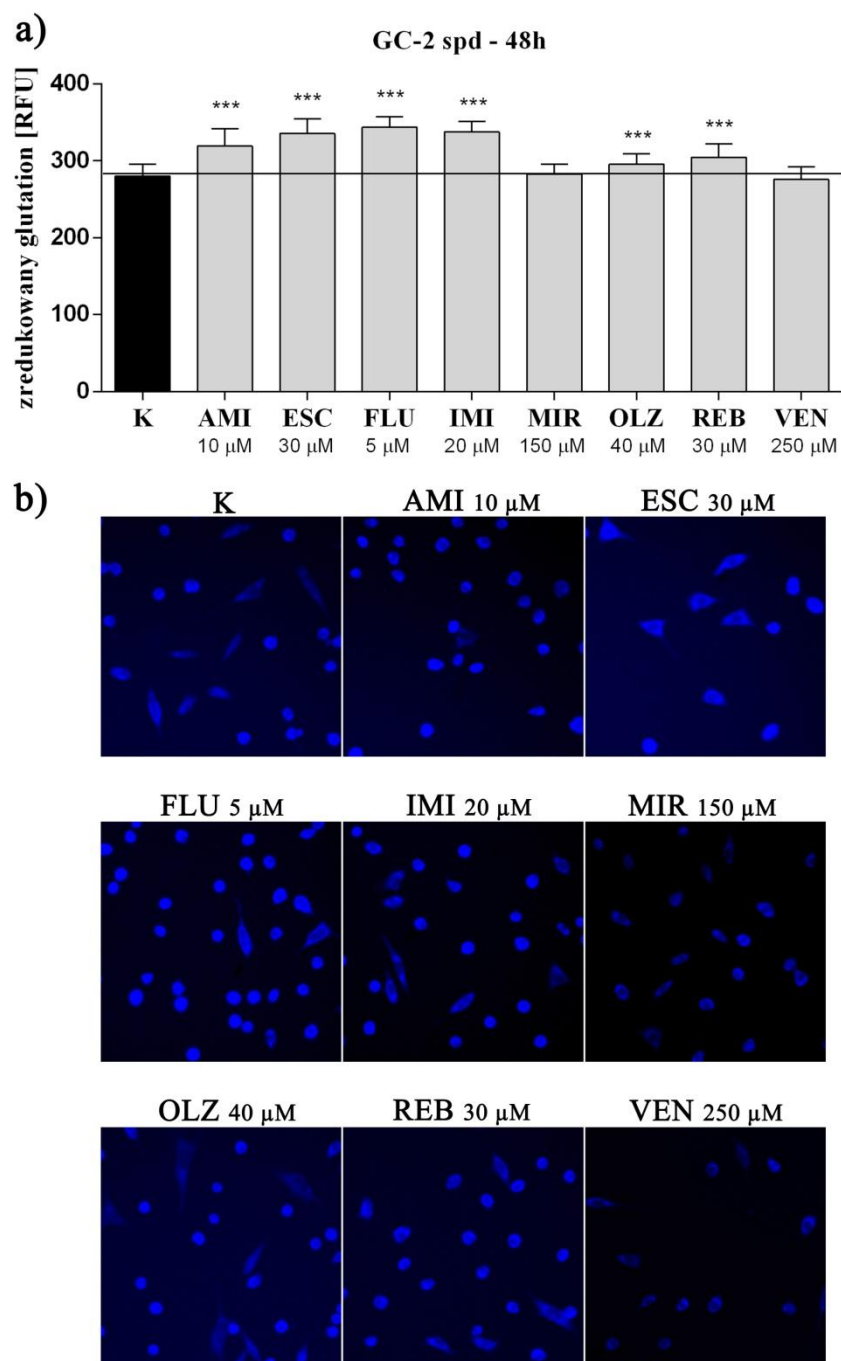


Fig. 4.21. Aktywacja mechanizmu redukcji glutationu przez komórki linii GC-2 spd po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (***) $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom zredukowanego glutationu w komórkach GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times).

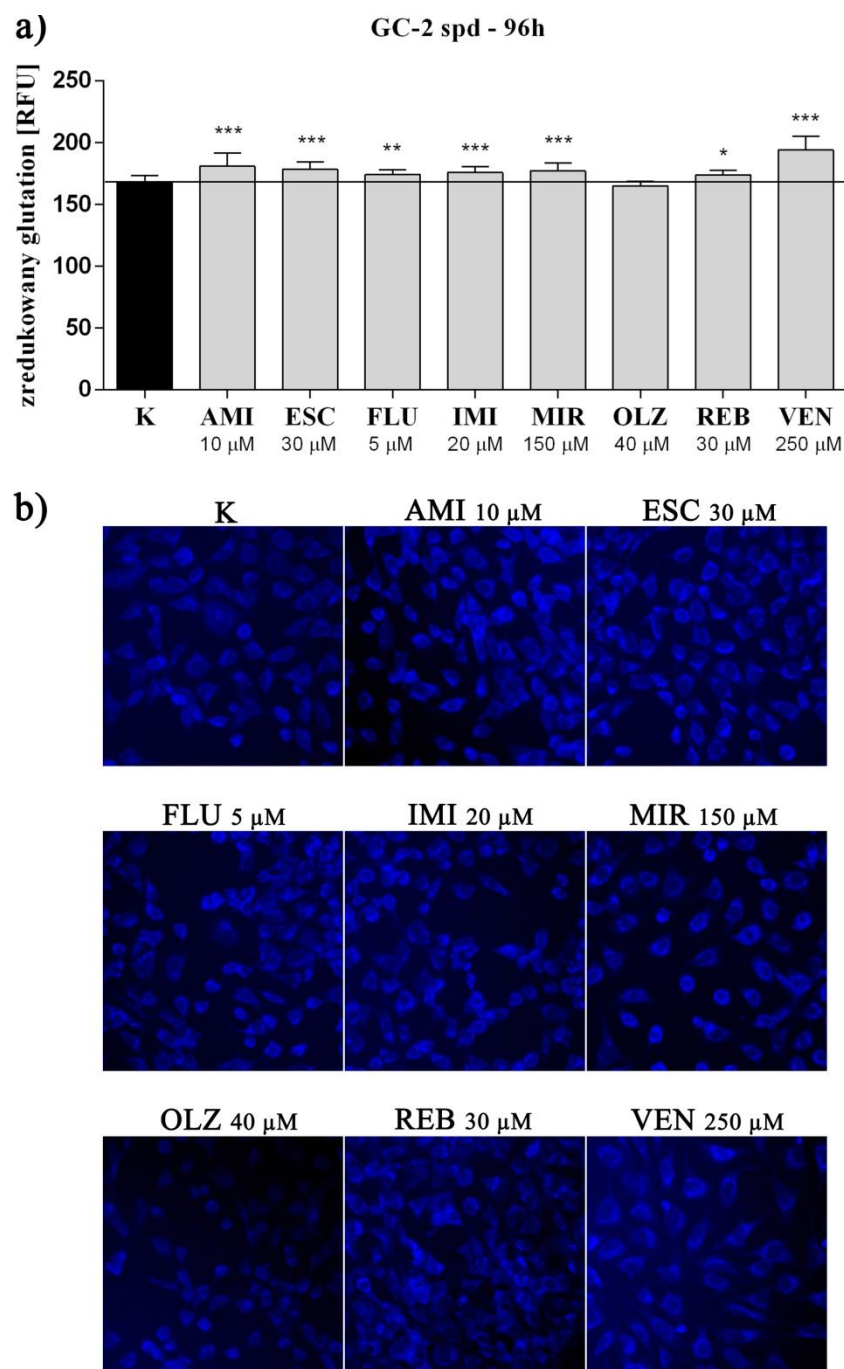


Fig. 4.22. Aktywacja mechanizmu redukcji glutationu przez komórki linii GC-2 spd po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 9 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów (a) wyrażone w postaci RFU $X \pm SD$ ($n=9 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia ukazujące poziom zredukowanego glutationu w komórkach GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times).

Tab. 4.1. Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godziną, a 96-godziną inkubacją z lekami. Zmienność statystyczną oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie ($^{\wedge}$ $p < 0.05$; $^{\wedge\wedge}$ $p < 0.01$; $^{\wedge\wedge\wedge}$ $p < 0.001$).

	GC-1 spg			GC-2 spd		
	Reaktywne formy tlenu	Reaktywne formy azotu	Zredukowany glutation	Reaktywne formy tlenu	Reaktywne formy azotu	Zredukowany glutation
KON	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^
AMI 10 μ M	^ ^ ^	ns	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^
ESC 30 μ M	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^
FLU 5 μ M	^ ^ ^	^ ^	^ ^ ^	ns	^ ^ ^	^ ^ ^
IMI 20 μ M	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^
MIR 150 μ M	^ ^ ^	^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^
OLZ 40 μ M	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	ns	^ ^ ^	^ ^ ^
REB 30 μ M	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^
VEN 250 μ M	^ ^ ^	^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^	^ ^ ^

Analiza przedstawiona w powyższej tabeli jednoznacznie wskazuje na wzrost produkcji reaktywnych form tlenu po 96h inkubacji z lekami w porównaniu do 48h (z wyjątkiem FLU i OLZ – linia GC-2 spd). Analogicznie zaobserwowano wzrost ilości reaktywnych form azotu wraz z wydłużeniem czasu inkubacji (z wyjątkiem AMI – linia GC-1 spg). Co więcej, we wszystkich układach eksperymentalnych odnotowano utrzymującą się w czasie ekspozycji redukcję poziomu glutationu komórkowego.

4.4. Morfologiczna ocena komórek

Zmiany wyglądu morfologicznego komórek mogą być kolejnym markerem toksyczności badanych związków. Oceny zmian morfologicznych komórek linii GC-1 spg i GC-2 spd dokonano przez 96 godzin inkubacji z badanymi lekami (dokumentację fotograficzną wykonywano co 24h). W przypadku linii GC-1 spg pierwsze widoczne zmiany morfologiczne były obserwowane już po 24h ekspozycji i postępowały wraz z upływem czasu. W porównaniu do kontroli we wszystkich układach eksperymentalnych komórki charakteryzowały się utratą kontaktu z podłożem naczynia hodowlanego, obkurczonym kształtem, fragmentacją oraz silną wakuolizacją cytoplazmy (Fig. 4. 23; Fig. 4.24.). Linia komórek GC-2 spd w większości przypadków oraz przez większość czasu inkubacji zachowywała prawidłowy wygląd morfologiczny. Jedynie pojedyncze komórki wykazywały zwiększoną ziarnistość cytoplazmy oraz oderwanie od podłoża. Wakuolizacja była obserwowana dopiero w 96 godzinie hodowli dla leków AMI, IMI, VEN (Fig. 4.25; Fig. 4.26.). Na poniższych panelach przedstawiono dokumentację fotograficzną hodowli linii komórkowych GC-1 spg oraz GC-2 spd wykonywane przez okres 96 godzin.

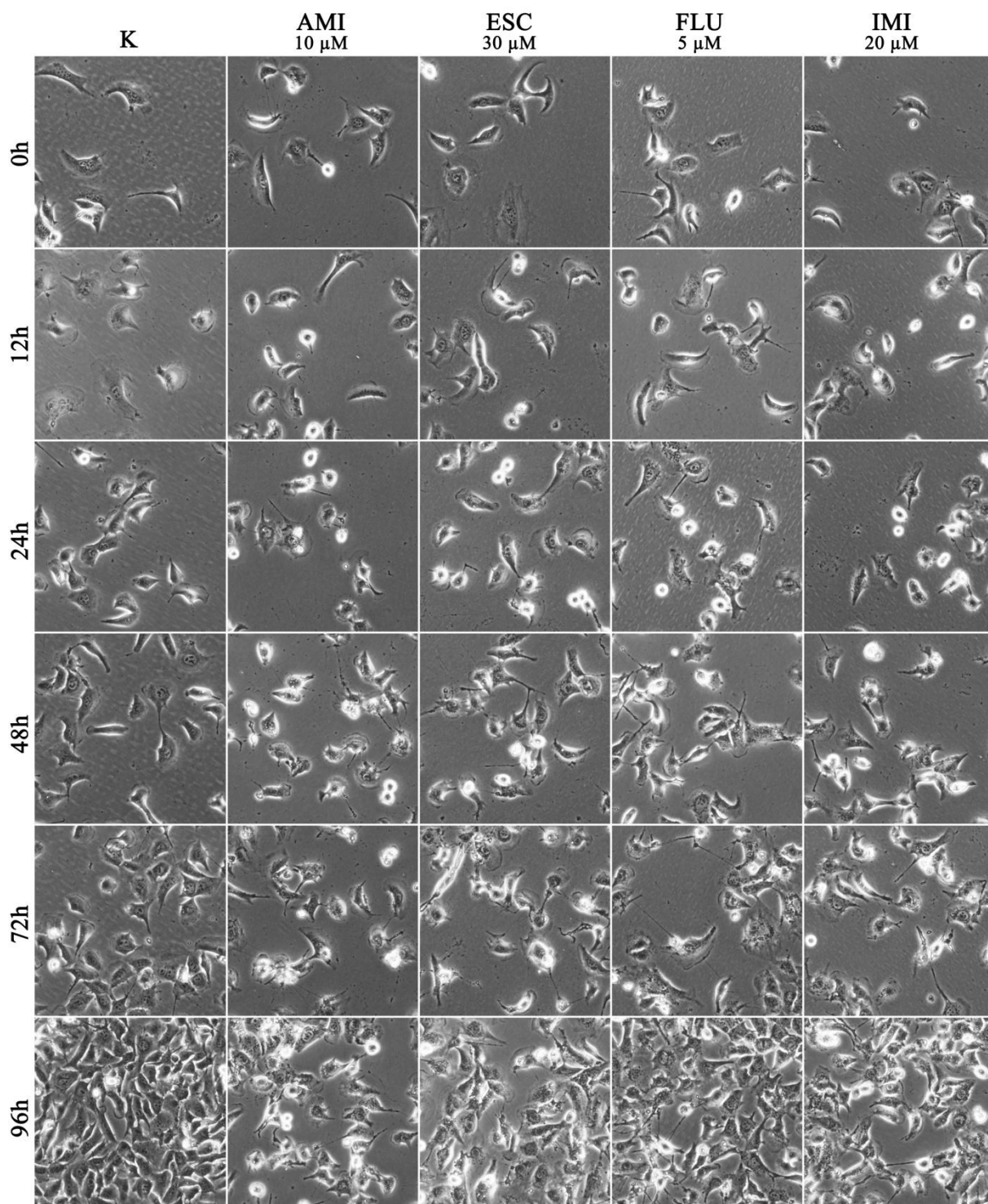


Fig. 4.23. Obraz zmian morfologicznych komórek linii GC-1 spg poddanych działaniu leków: AMI, ESC, FLU, IMI przez okres 96 godzin (powiększenie 10 \times).

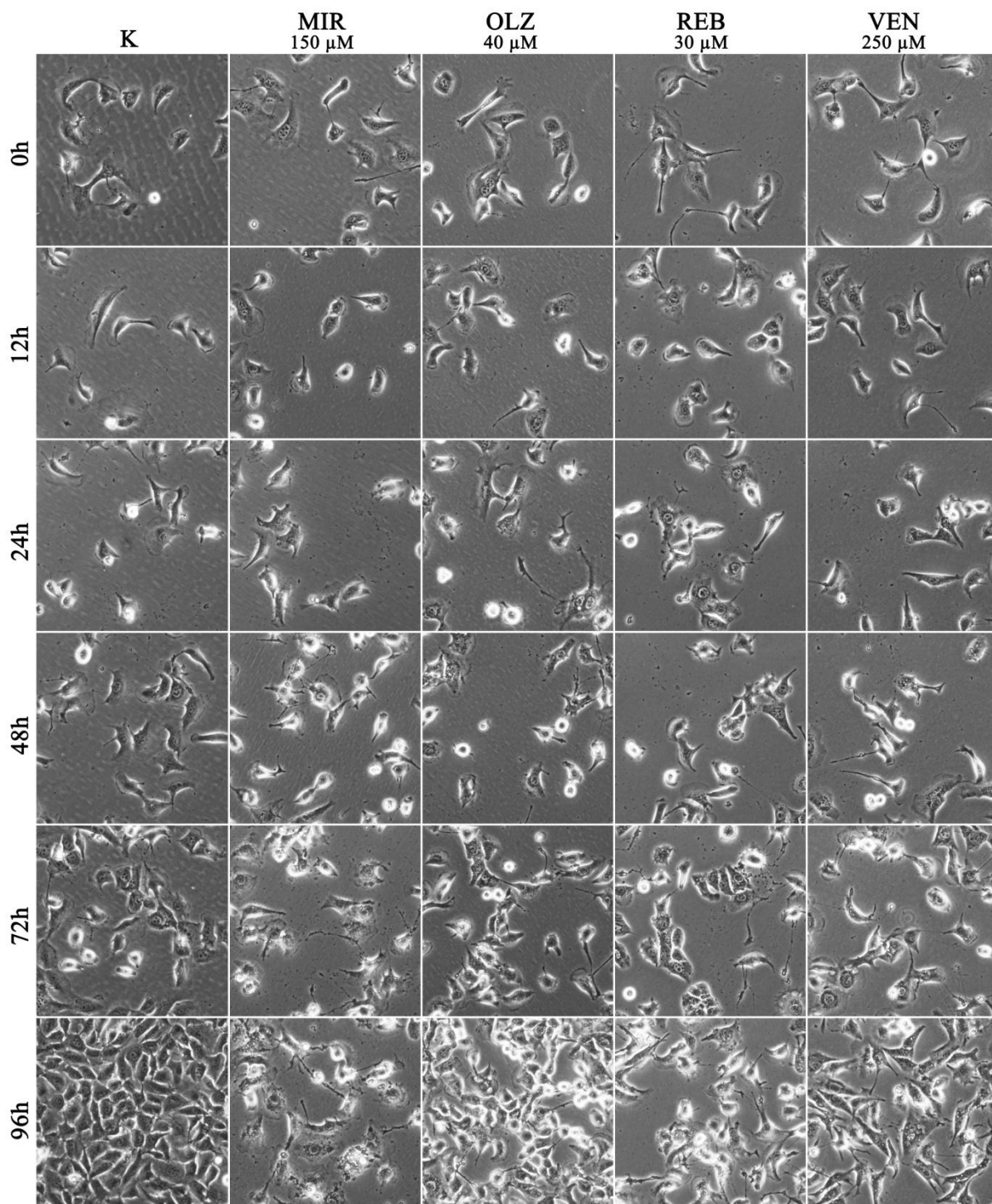


Fig. 4.24. Obraz zmian morfologicznych komórek linii GC-1 spg poddanych działaniu leków: MIR, OLZ, REB, VEN przez okres 96 godzin (powiększenie 10 \times).

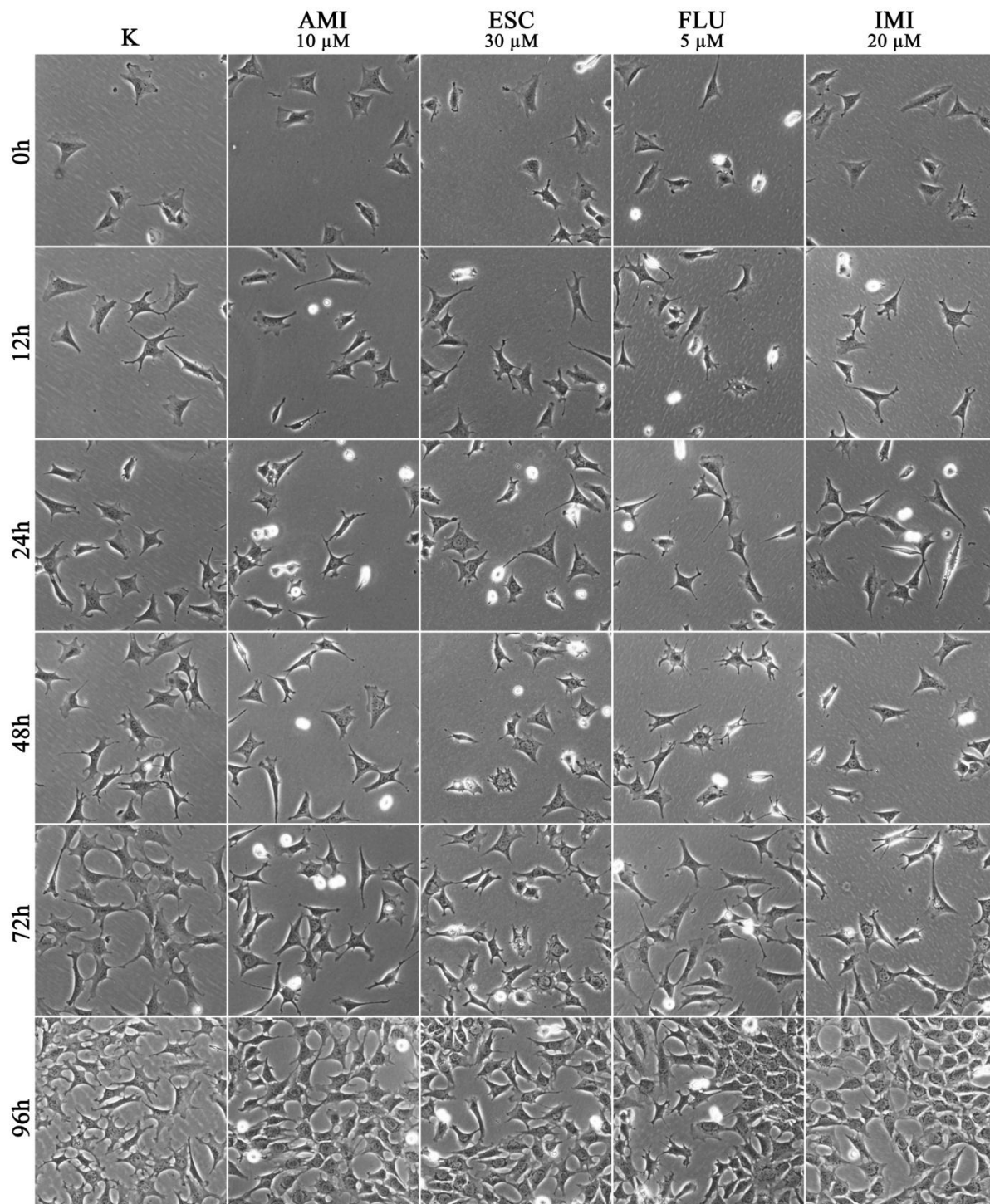


Fig. 4.25. Obraz zmian morfologicznych komórek linii GC-2 spd poddanych działaniu leków: AMI, ESC, FLU, IMI przez okres 96 godzin (powiększenie 10 \times).

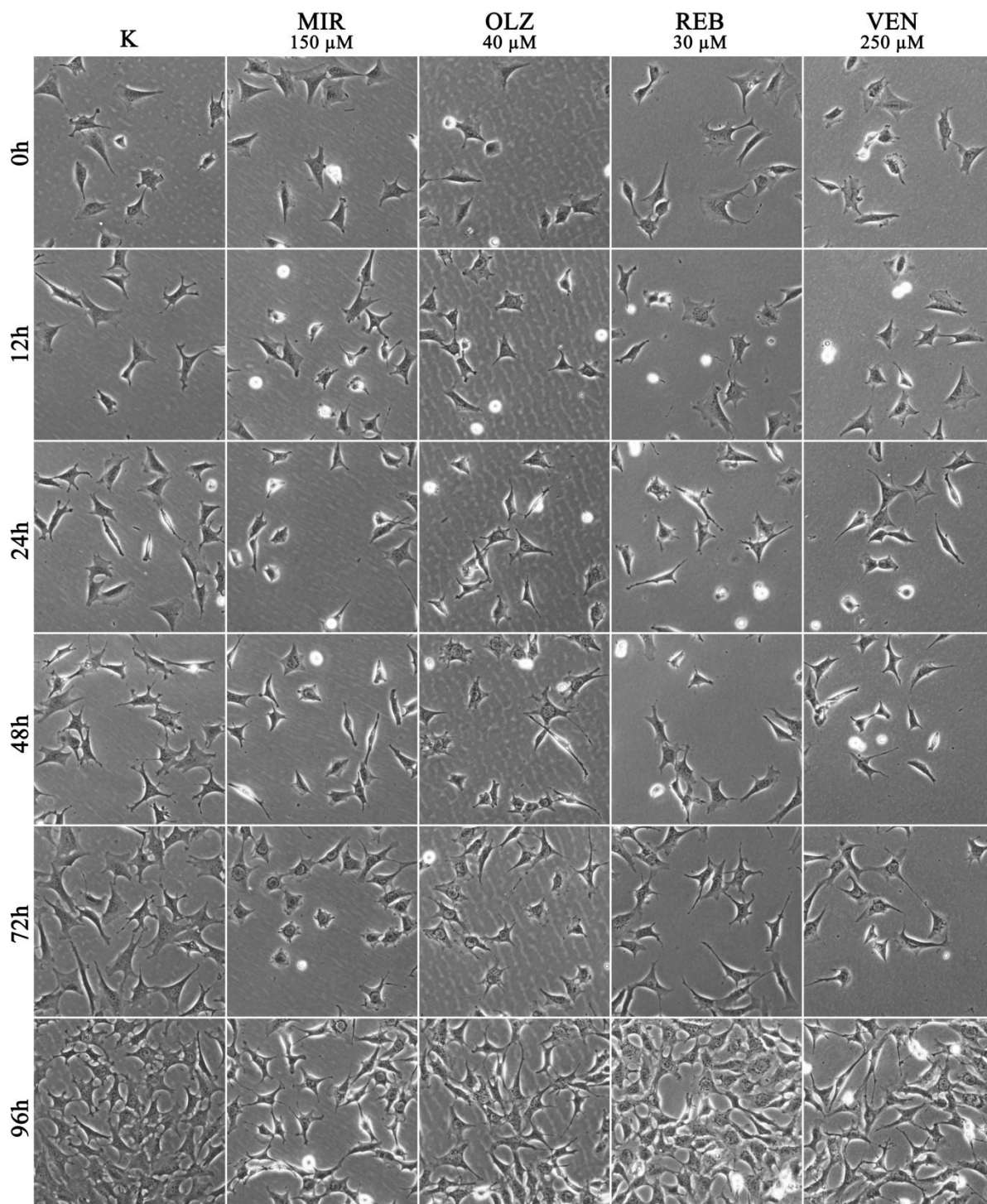


Fig. 4.26. Obraz zmian morfologicznych komórek linii GC-2 spd poddanych działaniu leków: MIR, OLZ, REB, VEN przez okres 96 godzin (powiększenie 10 \times).

4.5. Ocena przemian energetycznych w komórkach

Spadki aktywności metabolicznej komórek obserwowane w jednym z pierwszych eksperymentów mogą wynikać z nieprawidłowości zachodzących w obrębie mitochondriów. Dodatkowo reaktywne formy tlenu i azotu również odgrywają ważną rolę w procesie wytwarzania energii. Z tego powodu, analiza poziomu ATP komórkowego może być dobrym wskaźnikiem do oceny efektów toksycznego działania leków przeciwdepresyjnych w testowanych hodowlach *in vitro*.

Po 48h ekspozycji na leki jedynie w 3 układach eksperymentalnych linii GC-1 spg odnotowaliśmy istotny statystycznie wzrost produkcji ATP (AMI, IMI, OLZ). Co interesujące, w tym samym czasie komórki linii GC-2 spd wykazywały obniżenie poziomu przemian energetycznych (FLU, MIR, VEN). Co więcej, najbardziej wyraźny spadek odnotowano dla komórek poddanych działaniu MIR i VEN (obie badane linie) po 96h inkubacji. Dla pozostałych leków również obserwowano istotny statystycznie spadek poziomu ATP po 96h inkubacji. Wyjątek stanowiły dwa leki – ESC i OLZ (linia GC-1 spg), gdzie poziom komórkowego ATP pozostał na poziomie kontrolnym (Fig. 4. 27. a-b; Fig. 4.28. a-b).

Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godzinną, a 96-godzinną inkubacją z lekami dla poziomu komórkowego ATP podano poniżej w Tab. 4.2.

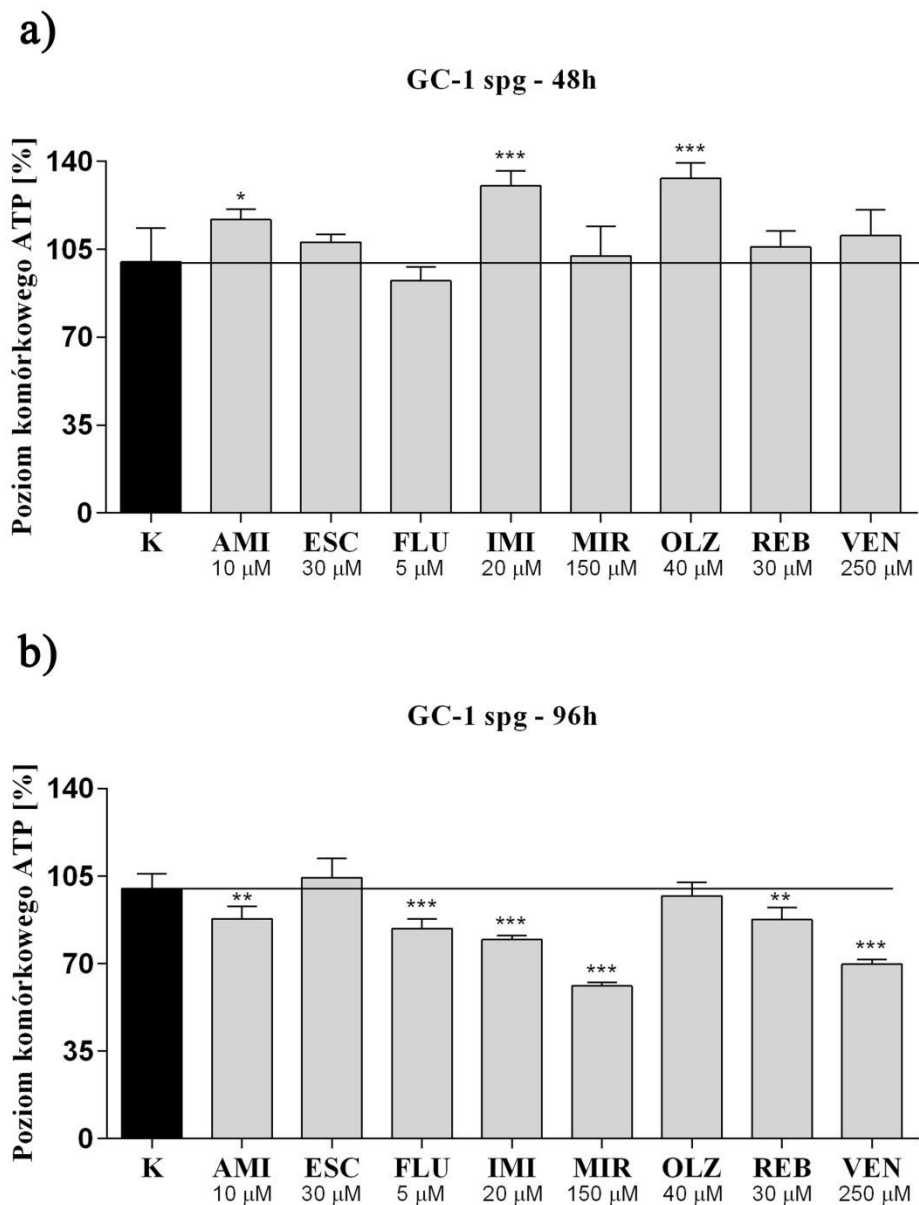


Fig. 4.27. Przemiany energetyczne komórek linii GC-1 spg po 48h (a) i 96h (b) inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów wyrażone w postaci %; $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

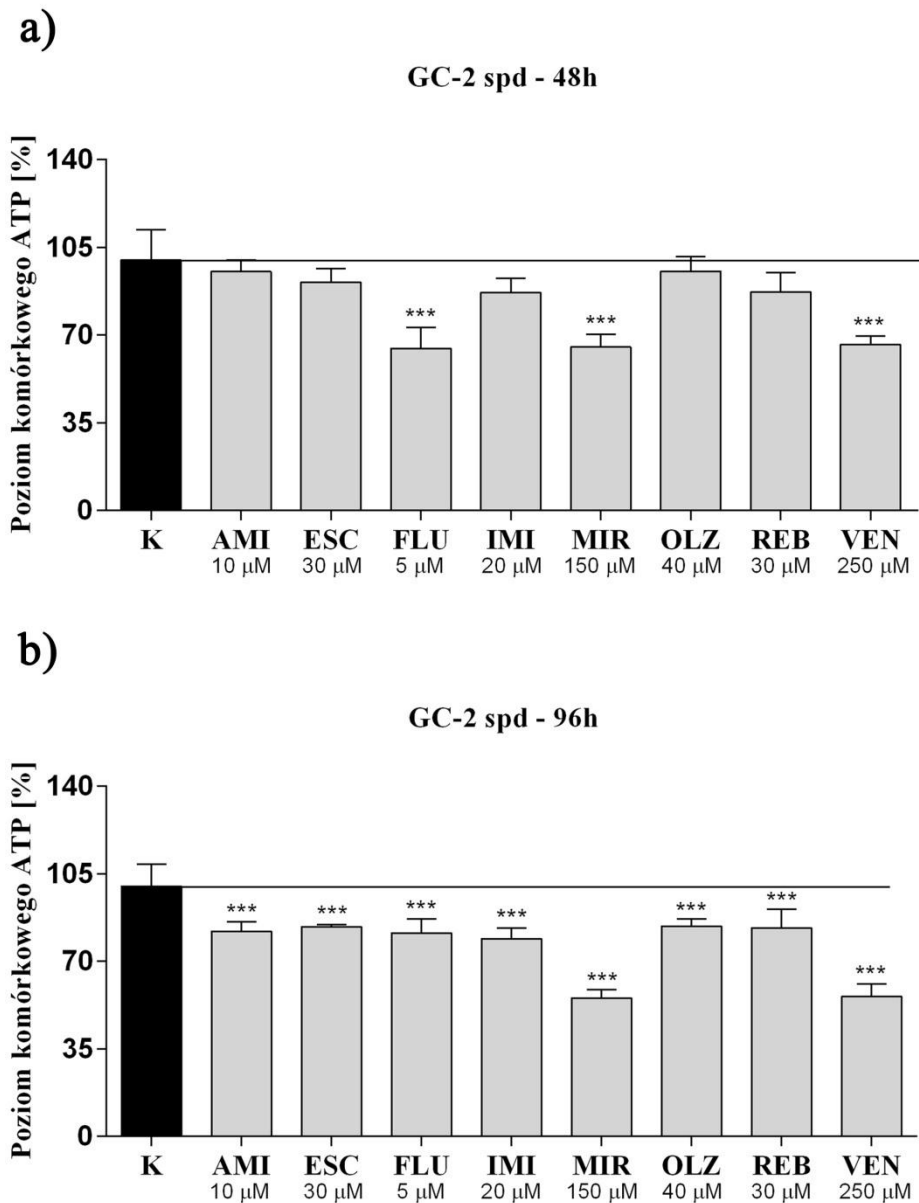


Fig. 4.28. Przemiany energetyczne komórek linii GC-2 spd po 48h (a) i 96h (b) inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów wyrażone w postaci %; $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (***) $p < 0.001$.

4.6. Analiza profilu cyklu komórkowego

Po zakończeniu poprzednich badań eksperymentalnych, dokonano oceny profilu cyklu komórkowego badanych linii komórkowych należących do szlaku spermatogenezy. W tym celu wykonaliśmy ilościową analizę poszczególnych faz cyklu (G0-G1, S, G2/M) z wykorzystaniem cytometru obrazowego. Krótkotrwała inkubacja (48h) spowodowała skrócenie fazy G0-G1 dla leku FLU (linia GC-1 spg) oraz VEN (linia GC-2 spd). Z kolei dla leku ESC i REB skróceniu uległa faza S cyklu (wyłącznie linia GC-2 spd). Wraz z upływem czasu ekspozycji na leki przeciwdepresyjne obserwowano znaczne skrócenie fazy G0-G1 (linia GC-1 spg) dla większości układów eksperymentalnych. Podobna tendencja nie została potwierdzona dla drugiej badanej linii komórkowej (Fig. 4.29. a-b; Fig. 4.30. a-b).

Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godziną, a 96-godziną inkubacją z lekami dla profilu cyklu komórkowego podano poniżej w Tab. 4.2.

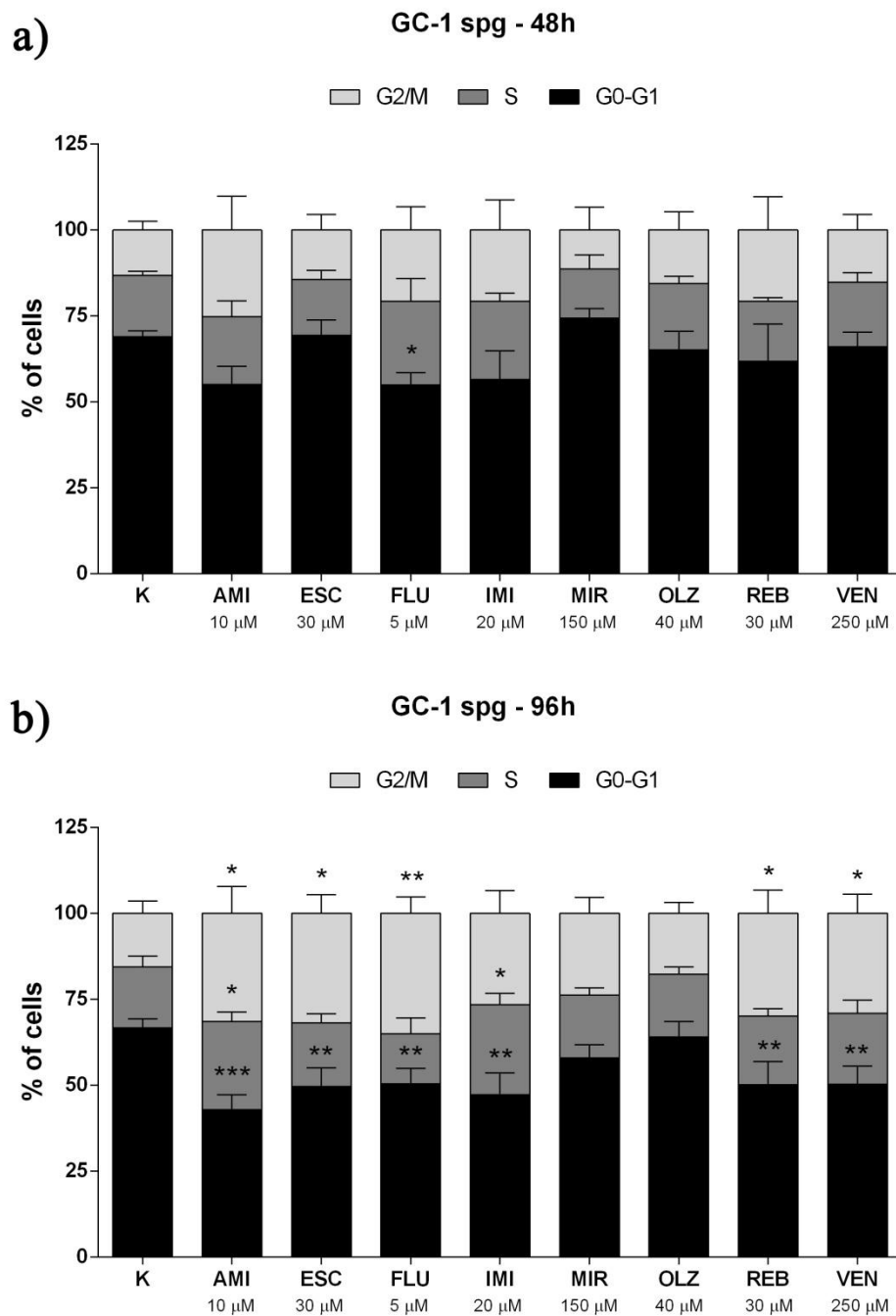


Fig. 4.29. Profil cyklu komórkowego komórek GC-1 spg poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych przez 48h (a) i 96h (b) inkubacji. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów wyrażone w postaci %; $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

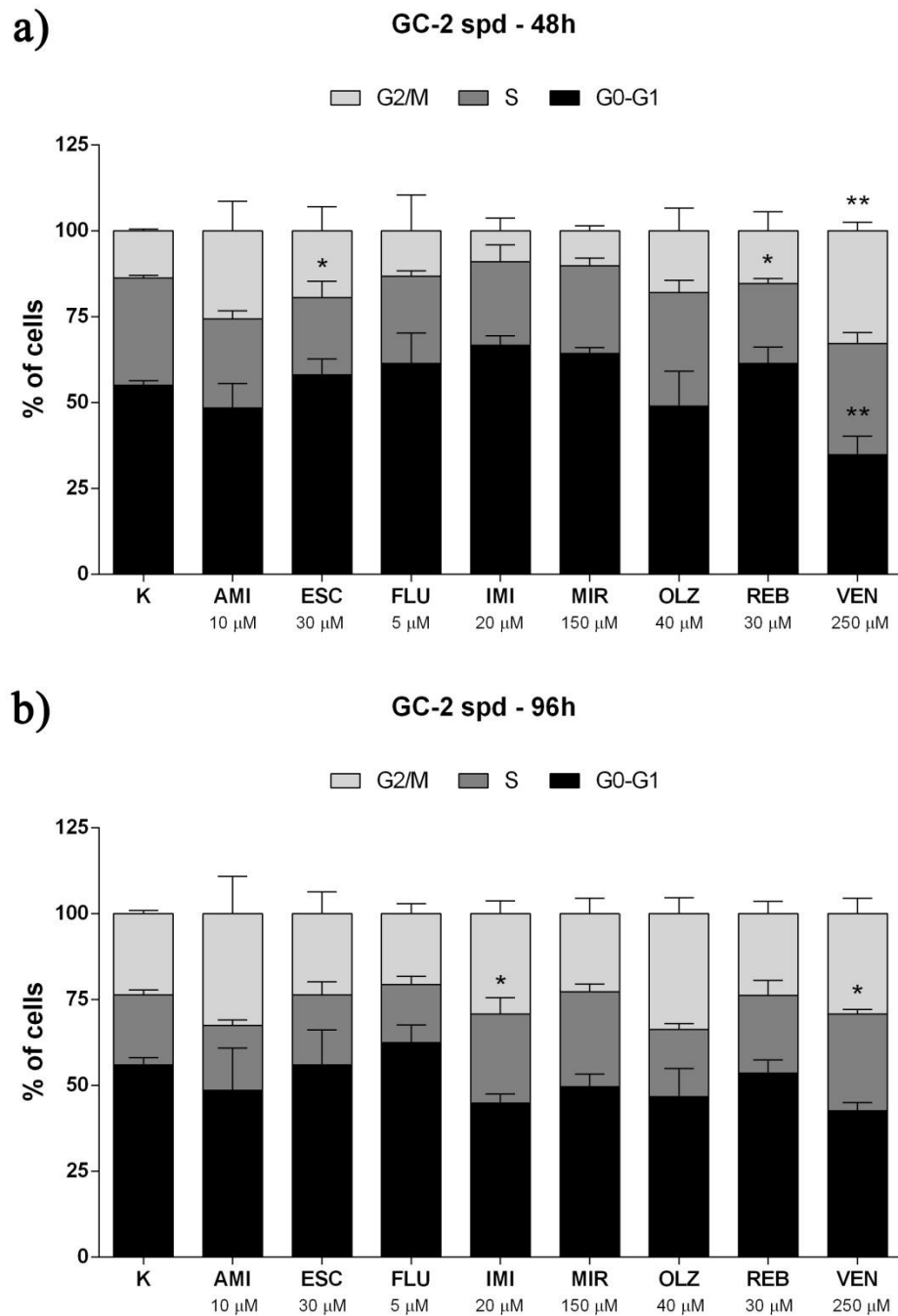


Fig. 4.30. Profil cyklu komórkowego komórek GC-2 spd poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych przez 48h (a) i 96h (b) inkubacji. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów wyrażone w postaci %; $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.7. Ocena uszkodzeń materiału genetycznego komórek

Utrzymujący się stres oksydacyjno-nitrozacyjny może prowadzić do powstawania uszkodzeń strukturalnych kwasów nukleinowych. Stąd, w następnym etapie eksperymentów dokonaliśmy oceny powstawania mikrojąder (MN) jako znacznika genotoksyczności leków w badanych liniach komórkowych. Odnotowaliśmy znaczny wzrost ich powstawania po 48h (z wyjątkiem IMI) w przypadku obu testowanych linii komórkowych. Po 96h ekspozycji odnotowano delikatny spadek w porównaniu z obserwacjami poczynionymi po 48h. Taka tendencja dotyczyła wszystkich układów eksperymentalnych (Fig. 4.31.-4.34.).

Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godzinną, a 96-godzinną inkubacją z lekami dla powstawania mikrojąder (MN) podano poniżej w Tab. 4.2.

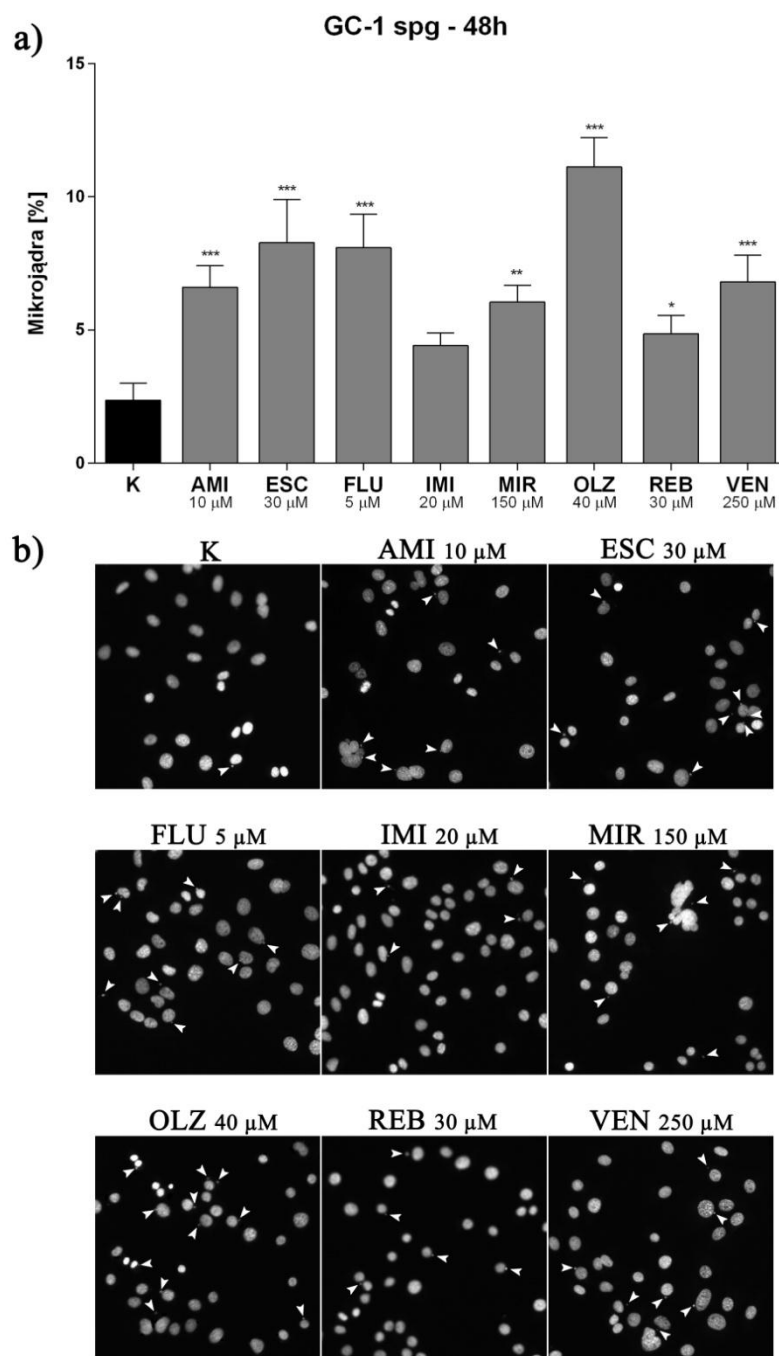


Fig. 4.31. Częstość występowania mikrojąder w komórkach linii GC-1 spg po 48h inkubacji z lekami (a). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów wyrażone w postaci %; $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia, białymi strzałkami oznaczono mikrojądra (b) (powiększenie $10\times$).

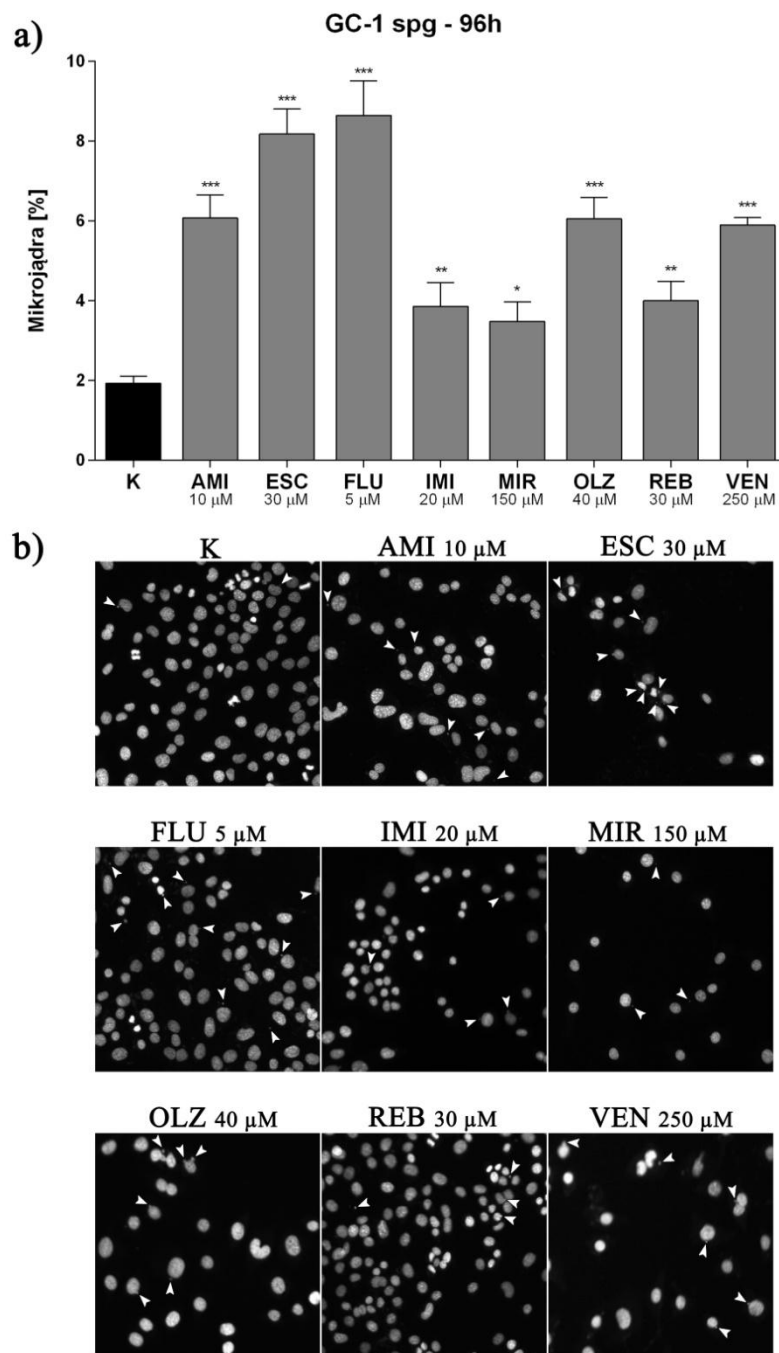


Fig. 4.32. Częstość występowania mikrojąder w komórkach linii GC-1 spg po 96h inkubacji z lekami (a). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów wyrażone w postaci %; $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia, białymi strzałkami oznaczono mikrojądra (b) (powiększenie $10\times$).

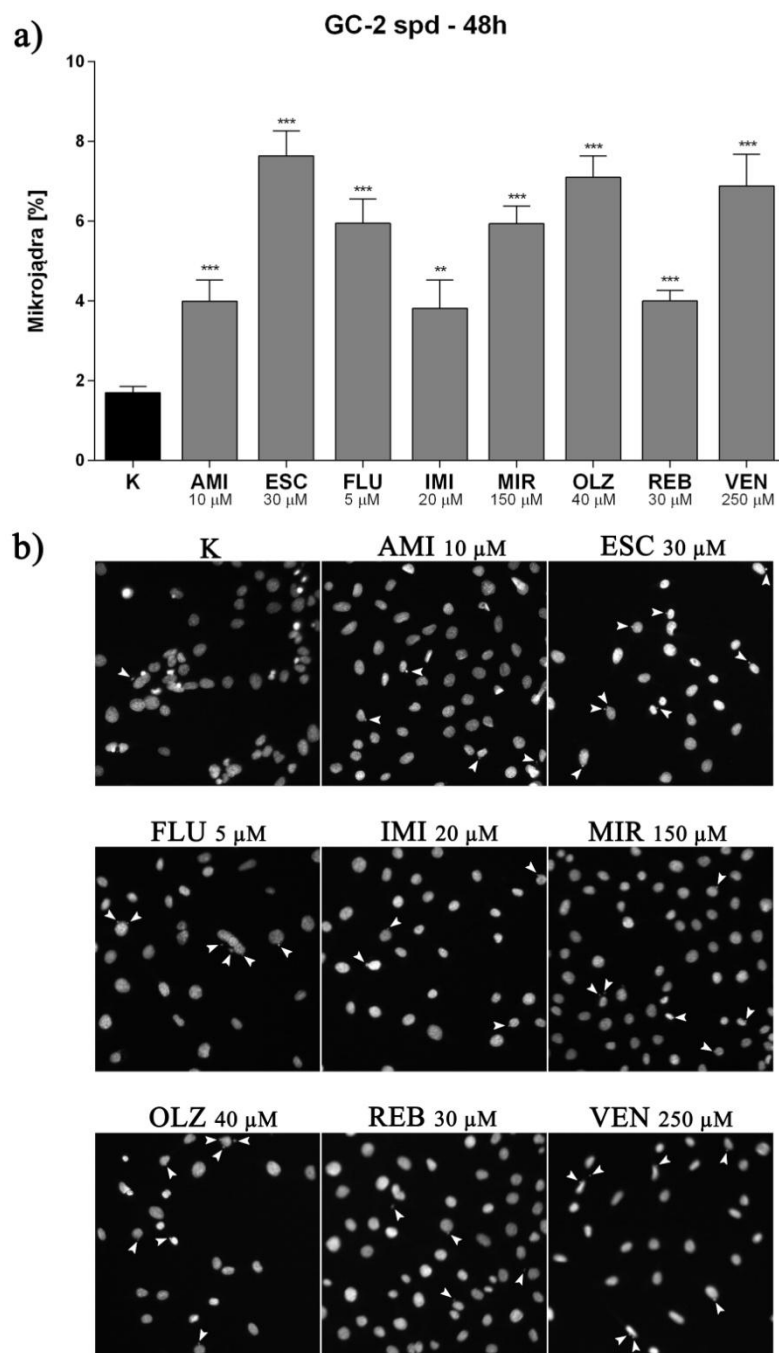


Fig. 4.33. Częstość występowania mikrojąder w komórkach linii GC-2 spd po 48h inkubacji z lekami (a). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów wyrażone w postaci %; $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia, białymi strzałkami oznaczono mikrojądra (b) (powiększenie $10\times$).

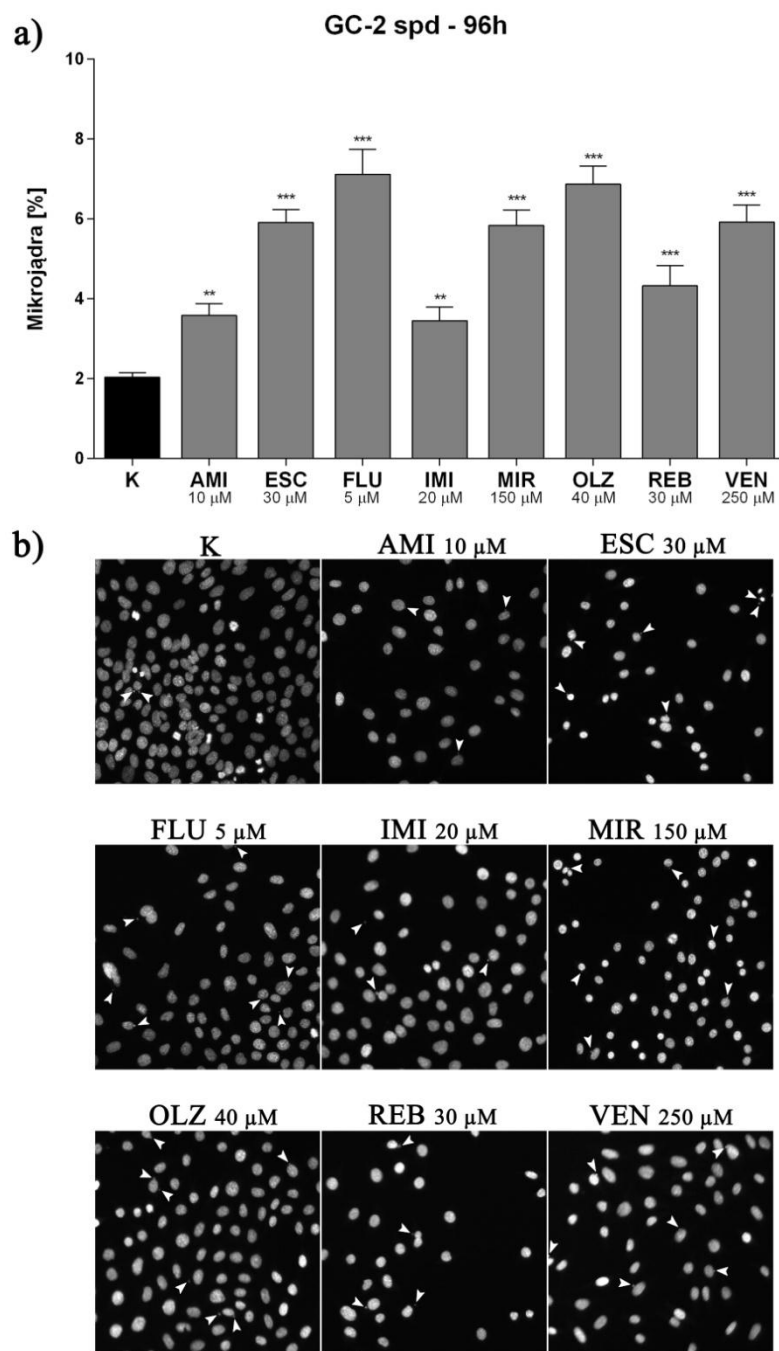


Fig. 4.34. Częstość występowania mikrojąder w komórkach linii GC-2 spd po 96h inkubacji z lekami (a). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów wyrażone w postaci %; $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia, białymi strzałkami oznaczono mikrojądra (b) (powiększenie $10\times$).

Tab. 4.2. Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godziną, a 96-godziną inkubacją z lekami. Zmienność statystyczną oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie ($^{\wedge} p < 0.05$; $^{\wedge\wedge} p < 0.01$; $^{\wedge\wedge\wedge} p < 0.001$).

	GC-1 spg					GC-2 spd				
	ATP	G0-G1	Cykl S	G2/M	MN	ATP	G0-G1	Cykl S	G2/M	MN
KON	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMI 10 μ M	$^{\wedge\wedge\wedge}$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ESC 30 μ M	ns	$^{\wedge\wedge}$	ns	$^{\wedge}$	ns	ns	ns	ns	ns	$^{\wedge\wedge}$
FLU 5 μ M	ns	ns	$^{\wedge}$	ns	ns	$^{\wedge}$	ns	$^{\wedge}$	ns	ns
IMI 20 μ M	$^{\wedge\wedge\wedge}$	ns	ns	ns	ns	ns	$^{\wedge\wedge}$	ns	$^{\wedge\wedge}$	ns
MIR 150 μ M	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge}$	ns	ns	$^{\wedge\wedge}$	ns	ns	ns	ns	ns
OLZ 40 μ M	$^{\wedge\wedge\wedge}$	ns	ns	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	ns	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge}$	ns
REB 30 μ M	$^{\wedge\wedge}$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
VEN 250 μ M	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge}$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Dalsza analiza wykazała istotny statystycznie spadek komórkowego ATP w komórkach GC-1 spg po 96h w stosunku do 48h (z wyjątkiem ESC i FLU). W przypadku linii komórek GC-2 spd obserwowano podobną tendencję jednakże uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie. Profil cyklu komórkowego nieznacznie różnił się pomiędzy dwoma czasami ekspozycji na leki. Zmiany dotyczyły głównie skrócenia fazy G0-G1 (ESC, MIR, VEN – linia GC-1 spg; IMI – linia GC-2 spd), skrócenia fazy S (FLU – linia GC-1 spg; FLU, OLZ – linia GC-2 spd) oraz wydłużenia fazy G2/M (ESC – linia GC-1 spg; IMI, OLZ – linia GC-2 spd). W odniesieniu do mikrojąder obserwowano redukcję ich ilości wraz ze wzrostem czasu inkubacji (w przypadku MIR, OLZ – linia GC-1 spg; ESC – linia GC-2 spd).

4.8. Zmiany w ekspresji genów odgrywających kluczową rolę w podziale mejotycznym

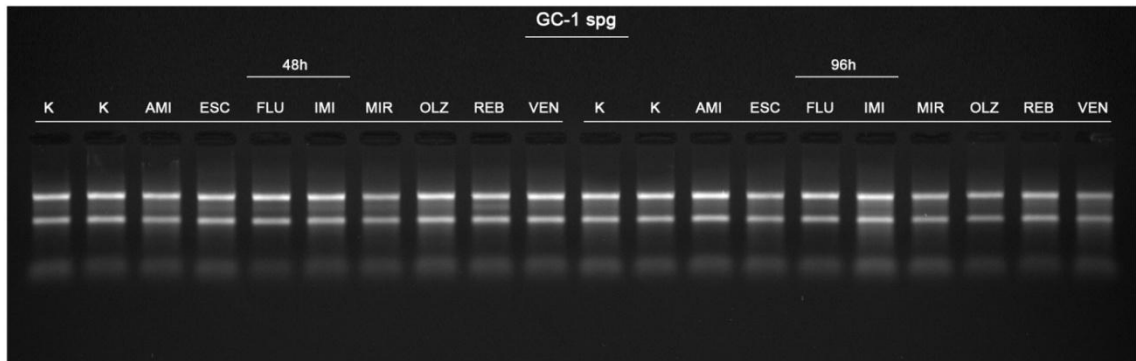
Analiza zmian ilościowych w ekspresji genów odpowiedzialnych za tworzenie struktury kompleksu synaptonemalnego (*SCP1*, *SCP3*) oraz białka stabilizującego tworzenie wrzeciona kariokinetycznego (*NuMA*) metodą Real-Time PCR została przeprowadzona na podstawie amplifikacji cząsteczki mRNA. W tym celu całkowite RNA zostało wyizolowane po 48h i 96h inkubacji komórek z lekami, a następnie dokonano oceny jakościowej na żelu agarozowym. W wyniku rozdziału elektroforetycznego obserwowano dwie widoczne frakcje o stałych sedymentacji 18S oraz 28S. Intensywność świecenia frakcji 28S w stosunku do 18S była blisko dwukrotnie wyższa co świadczy o wysokiej jakości preparatów (Fig. 4.35. (a); Fig. 4.36. (a)).

Tak uzyskane RNA stanowiło matrycę do syntezy cząsteczki cDNA. Poziom ekspresji badanych genów został znormalizowany względem genu referencyjnego *18S rRNA*. Obliczono różnicę ekspresji genów *SCP1*, *SCP3* i *NuMa* pomiędzy próbkami, a próbą referencyjną. Znormalizowaną wartość średnią poziomu ekspresji wyliczono według wzoru: $R = 2^{-\Delta\Delta CT}$. Krzywe ekspresji dla wszystkich genów przedstawiono na Fig. 4.35. (b) oraz Fig. 4.36. (b).

Analiza wyników wykazała, iż stosowane leki przeciwdepresyjne powodują istotne statystycznie zmiany ekspresji wybranych genów w zakresie czasu ekspozycji 48h i 96h. Dla genów *SCP1* i *SCP3* najwyższy poziom ekspresji odnotowano dla leków ESC, FLU oraz VEN (obie badane linie komórkowe). Z kolei najniższy poziom ekspresji obserwowano w układach z lekiem MIR. Zmiany w poziomie ekspresji genu *NuMa* nie były już tak bardzo widoczne jak w przypadku dwóch poprzednich genów, jednakże w tym przypadku podobnie odnotowano istotne statystycznie różnice głównie dla komórek linii GC-2 spd. Również i w tym wypadku najwyższy wzrost po inkubacji z lekami ESC, FLU, VEN (tylko linia GC-2 spd) oraz spadek dla MIR (obie linie komórkowe). Co interesujące, po 96h inkubacji odnotowano obniżenie ekspresji *NuMa* w przypadku układów leku IMI (obie linie komórkowe) (Fig. 4.37. a, b, c; Fig. 4.38. a, b, c).

Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godzinną, a 96-godzinną inkubacją z lekami dla poziomu ekspresji wybranych genów podano poniżej w Tab. 4.3.

a)



b)

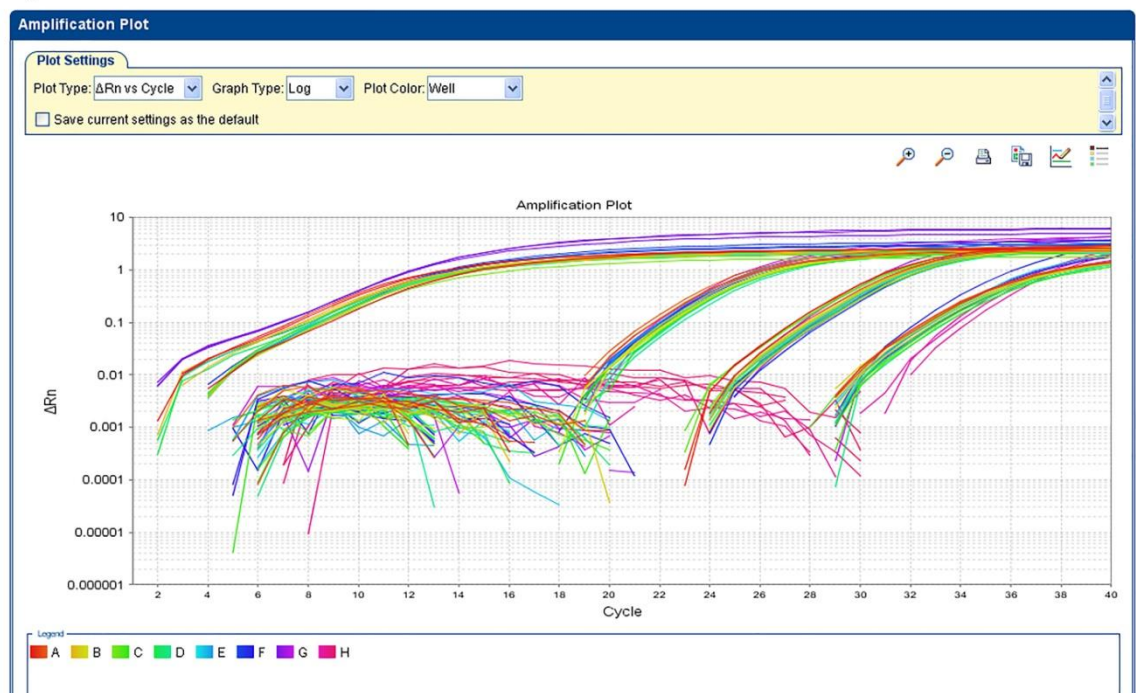
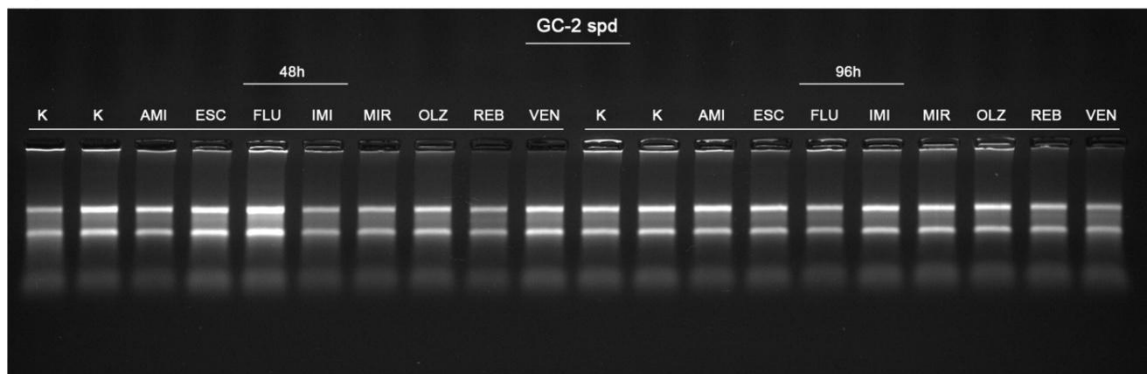


Fig. 4.35. Rozdział elektroforetyczny RNA wyizolowanego z linii komórkowej GC-1 spg poddanej działaniu leków przeciwdepresyjnych przez 48h i 96h (a). Przykładowe krzywe ekspresji charakteryzujące kinetykę amplifikacji sekwencji docelowych oraz zależność fluorescencji od cyklu reakcji Real-time PCR (b).

a)



b)

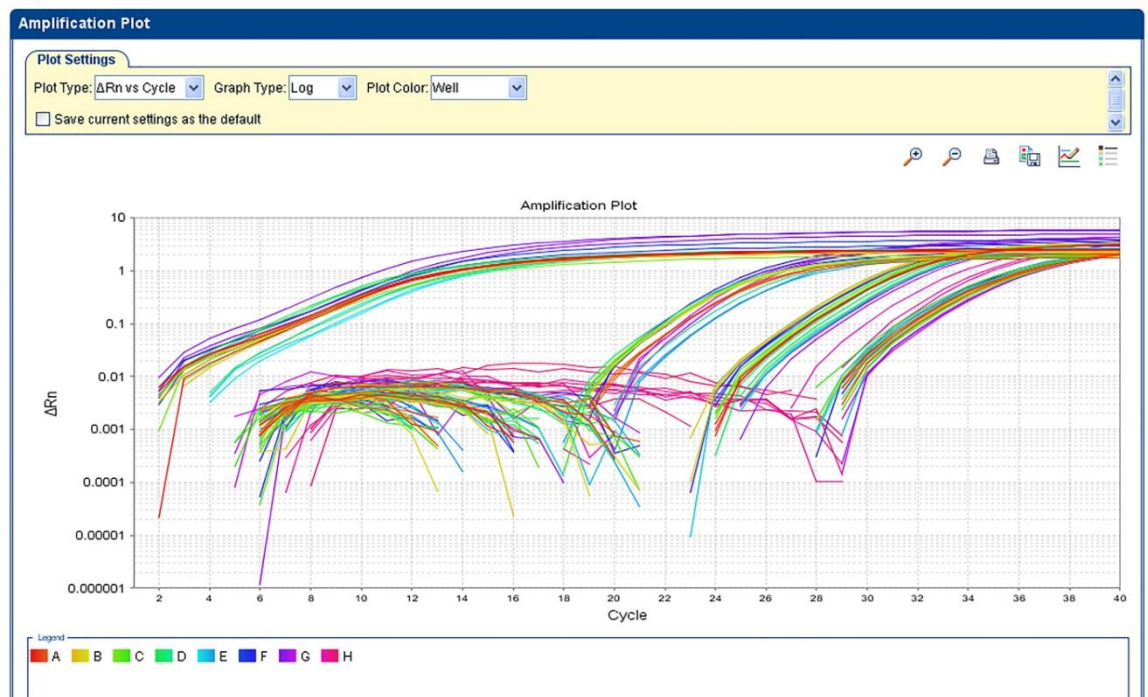


Fig. 4.36. Rozdział elektroforetyczny RNA wyizolowanego z linii komórkowej GC-2 spd poddanej działaniu leków przeciwdepresyjnych przez 48h i 96h (a). Przykładowe krzywe ekspresji charakteryzujące kinetykę amplifikacji sekwencji docelowych oraz zależność fluorescencji od cyklu reakcji Real-time PCR (b).

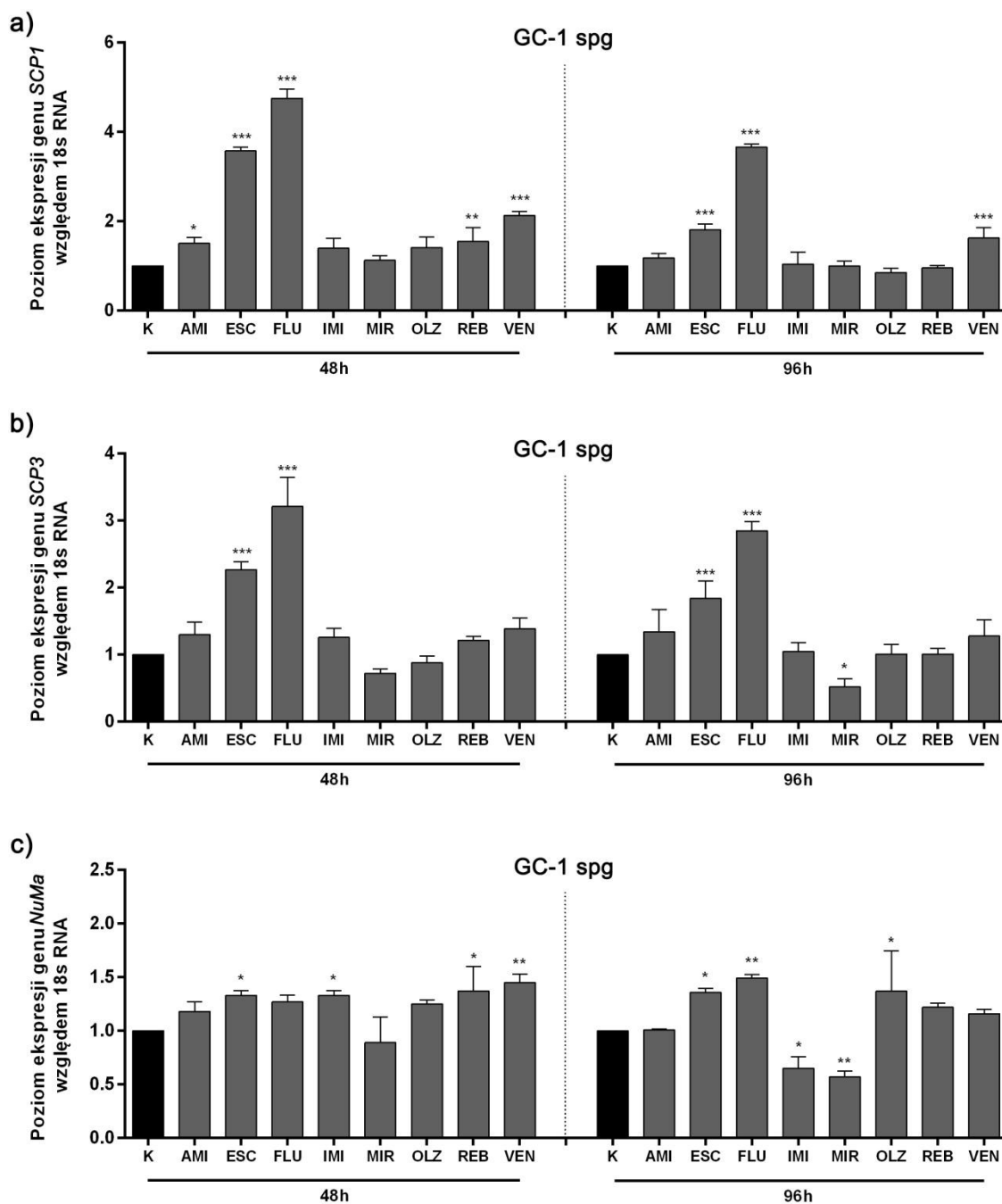


Fig. 4.37. Analiza poziomu ekspresji genów *SCP1* (a), *SCP3* (b), *NuMa* (c) względem genu referencyjnego *18S rRNA* dla komórek linii GC-1 spg poddanej działaniu leków przeciwdepresyjnych przez 48h i 96h. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

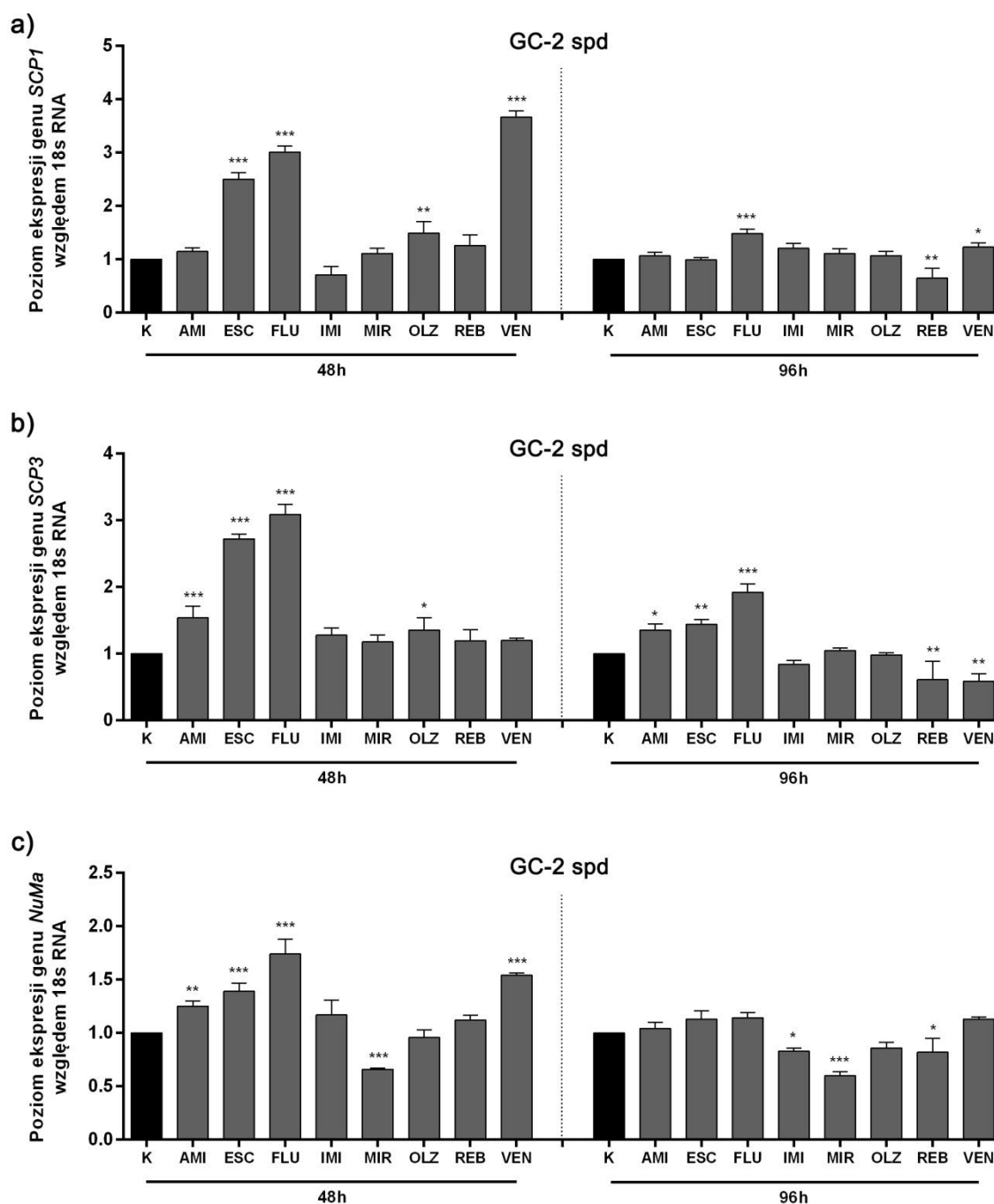


Fig. 4.38. Analiza poziomu ekspresji genów *SCP1* (a), *SCP3* (b), *NuMa* (c) względem genu referencyjnego *18S rRNA* dla komórek linii GC-2 spd poddanej działaniu leków przeciwdepresyjnych przez 48h i 96h. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Tab. 4.3. Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godziną, a 96-godziną inkubacją z lekami. Zmienność statystyczną oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie ($^{\wedge} p < 0.05$; $^{\wedge\wedge} p < 0.01$; $^{\wedge\wedge\wedge} p < 0.001$).

	GC-1 spg			GC-2 spd		
	SCP1	SCP3	NuMa	SCP1	SCP3	NuMa
KON	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMI 10 μ M	ns	ns	ns	ns	ns	$^{\wedge}$
ESC 30 μ M	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge}$	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge}$
FLU 5 μ M	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge}$	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$
IMI 20 μ M	ns	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$
MIR 150 μ M	ns	ns	$^{\wedge\wedge}$	ns	ns	ns
OLZ 40 μ M	$^{\wedge}$	ns	ns	$^{\wedge\wedge}$	$^{\wedge}$	ns
REB 30 μ M	$^{\wedge}$	ns	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$
VEN 250 μ M	ns	ns	$^{\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$

Porównując uzyskane wyniki dotyczące poziomu ekspresji genów pomiędzy dwoma czasami inkubacji z lekami (48-96h) odnotowano najczęściej istotnych zmian (spadki poziomu ekspresji po 96h) w przypadku komórek poddanych działaniu ESC, FLU (linia GC-1 spg) oraz ESC, FLU, IMI, OLZ, REB, VEN (linia GC-2 spd). Obserwowane spadki ekspresji genów po dłuższym czasie ekspozycji dotyczyły obu linii komórkowych oraz wszystkich 3 badanych genów. Jedynie komórki wystawione na działanie AMI oraz MIR (linia GC-1 spg oraz GC-2 spd) nie wykazywały istotnych statystycznie różnic niezależnie od długości czasu ekspozycji na leki.

4.8. Analiza ścieżek sygnalizacyjnych wewnątrzkomórkowej

W odpowiedzi na uszkodzenia komórek może dojść do aktywacji wielu białek i różnych ścieżek sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Podczas badań dokonaliśmy analizy kilku z nich, co wymagało wydzielenia kilku etapów badań w zależności od rodzaju aktywowanej ścieżki (Fig. 4.39; Fig. 4.44.).

Ocena nieenzymatycznych mechanizmów odpowiedzi komórek na stres oksydacyjno-nitrozacyjny

Analiza statystyczna wykazała że krótkotrwała inkubacja (48h) powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz czynnika wzrostu fibroblastów FGF2. Najwyższy poziom ekspresji NF- κ B obserwowano w przypadku komórek linii GC-1 spg wystawionych na działanie FLU, IMI, REB, VEN. Linia GC-2 spd charakteryzowała się również delikatnym wzrostem ekspresji, jednakże wyniki nie były istotne statystycznie. W układach leków IMI, MIR, OLZ (linia GC-1 spg i GC-2 spd) odnotowano wzrost poziomu białka FGF-2, natomiast w przypadku komórek GC-2 spd poddanych działaniu VEN potwierdzono spadek jego poziomu. Co interesujące, dłuższa ekspozycja na leki spowodowała wzrost poziomu badanych czynników w większości układów eksperymentalnych dla obu badanych linii komórkowych (Fig. 4.40. a-b; Fig. 4.45. a-b).

Ocena mechanizmów regulacji cyklu komórkowego

W kolejnym etapie przeprowadzono ocenę syntezy białek p16, p21, p27 i p53. W przypadku linii komórek GC-1 spg odnotowano wzrost poziomu wszystkich analizowanych białek niezależnie od czasu inkubacji (Fig. 4.40. c-d; Fig. 4.41. e-f). Druga linia również charakteryzowała się wzrostem syntezy wspomnianych białek po 48h i 96h inkubacji z lekami z wyłączeniem białka p27 po 48h (Fig. 4.45. c-d; Fig. 4.46. e-f).

Ocena mechanizmów chroniących telomerowe odcinki DNA

Uszkodzenia w obrębie telomerowego DNA wymagają specyficznych mechanizmów naprawy uszkodzeń w tych właśnie odcinkach DNA. Analiza syntezy białka TRF1 i TRF2 wykazała wzrost ich poziomu spowodowany działaniem leków w przypadku 48h i 96h inkubacji. Jedynym wyjątkiem był układ komórek linii GC-1 spg oraz czas inkubacji 48h gdzie obserwowano znaczny spadek poziomu dla układów OLZ, REB, VEN oraz 96h dla układów AMI, ESC, FLU, IMI oraz VEN (Fig. 4.41. g-h; Fig. 4.46. g-h).

Ocena mechanizmów zapewniających prawidłowe tworzenie wrzeciona kariokinetycznego

Zaburzenia w przebiegu mejozy są punktem krytycznym w procesie tworzenia gamet. Ogromną rolę w tym procesie odgrywa struktura kompleksu synaptonemalnego oraz jądrowe białko NuMA biorące udział w tworzeniu wrzeciona kariokinetycznego. Uzyskane wyniki wskazują na sumaryczny wzrost ekspresji SCP1, SCP3, NuMa, kalneksyna we wszystkich układach eksperymentalnych linii GC-1 spg z wyjątkiem OLZ dla genu SCP1 i 48h ekspozycji. Zaskakująco, wyniki oceny syntezy wszystkich wspomnianych białek w przypadku linii GC-2 spd sugerują wzrost ich ekspresji jedynie po krótkim czasie inkubacji 48h. Długi czas ekspozycji doprowadził do spadku ich poziomu w większości układów badanych leków (Fig. 4.42. i-j; Fig. 4.43. m-n; Fig. 4.47. i-j; Fig. 4.48. m-n). Co więcej, uzyskane wyniki poziomu syntezy badanych białek znajdują potwierdzenie we wcześniejszych dotyczących ekspresji genów na poziomie mRNA.

Ocena aktywacji procesu apoptozy

Utrzymujący się wysoki poziom stresu oksydacyjnego powoduje uszkodzenia błon mitochondrialnych i dysfunkcję łańcucha oddechowego prowadząc do apoptozy komórek. Na tej podstawie ostatnim etapem była ocena poziomu białek z rodziny proapoptotycznych (kaspaza 3) i antyapoptotycznych (Bcl-2) decydujących o śmierci lub przeżyciu komórki. Odnotowano wzrost syntezy kaspazy 3 po 48h w linii komórek

GC-1 spg (układy ESC, FLU, OLZ, VEN). Taki stan rzeczy utrzymywał się również po 96h ekspozycji z wyjątkiem FLU, gdzie poziom kaspazy 3 znacznie się obniżył. Analogiczne wyniki obserwowano dla układów AMI, MIR, REB. W przypadku drugiej linii komórkowej GC-2 spd we wszystkich układach odnotowano wzrost ekspresji kaspazy 3. Jednocześnie poziom syntezy Bcl-2 pozostawał na granicy kontroli (linia GC-1 spg) lub istotnie się obniżył (linia GC-2 spd) z wyjątkiem VEN (48h) i AMI (96h) (Fig. 4.43. o-p; Fig. 4.48. o-p).

Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godziną, a 96-godziną inkubacją z lekami dla poziomu syntezy wybranych białek podano poniżej w Tab. 4.4.

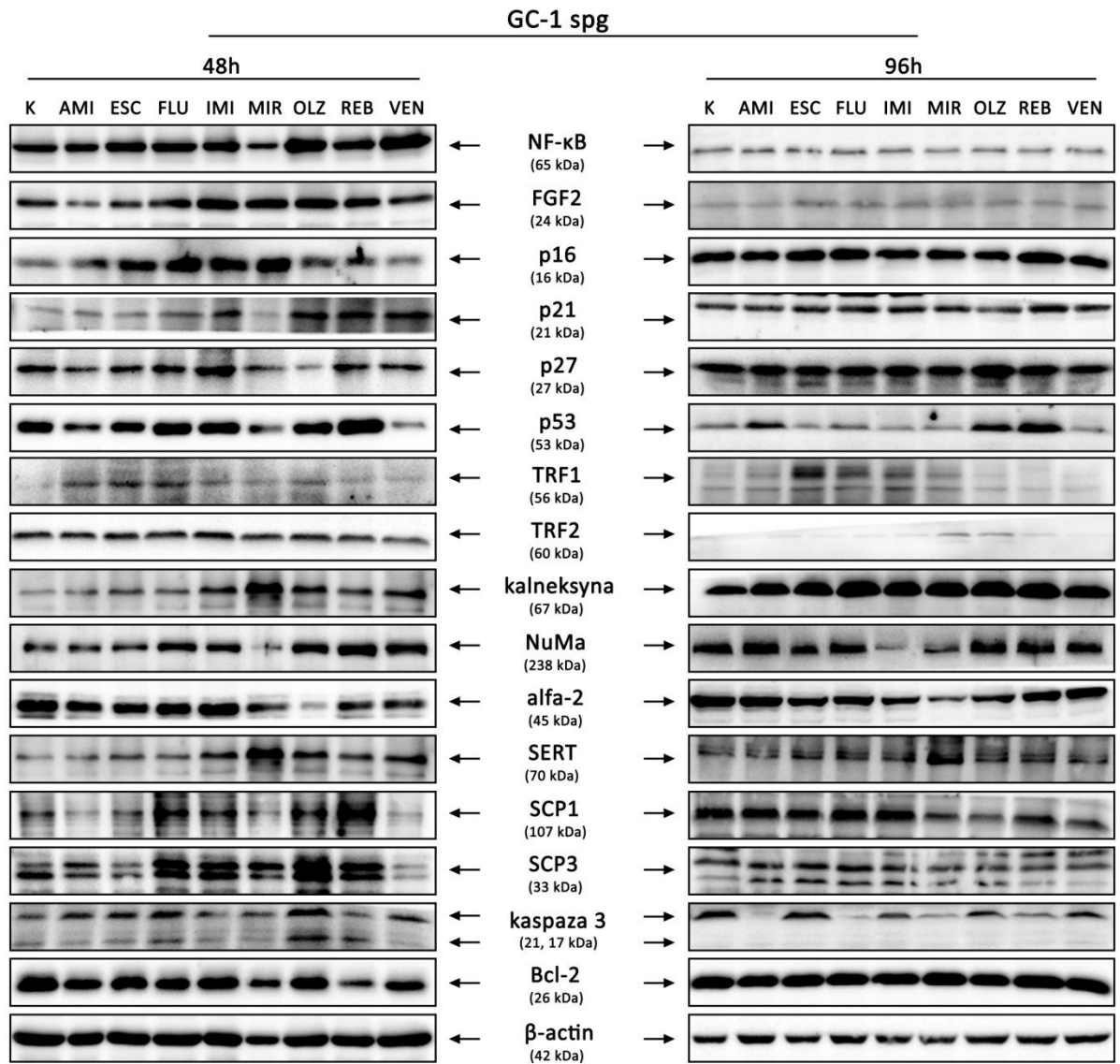


Fig. 4.39. Analiza profilu syntezy białek w komórkach GC-1 spg poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych przez 48h i 96h. Zdjęcia poglądowe ukazujące prążki uzyskane w wykorzystaniu techniki Western Blot.

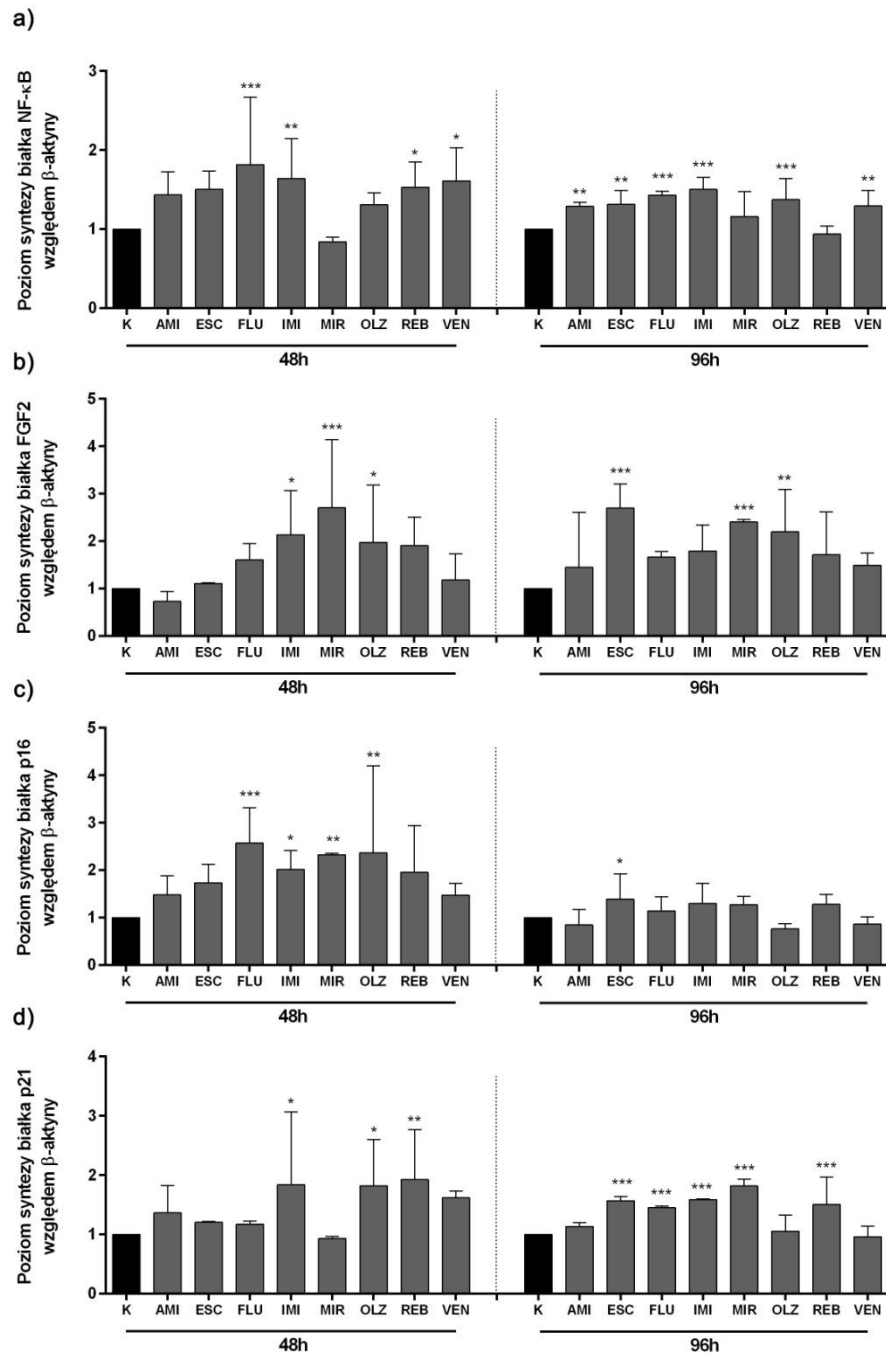


Fig. 4.40. Wartości pomiarów densytometrycznych prążków linii GC-1 spg otrzymanych po chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek: NF-κB (a), FGF2 (b), p16 (c), p21 (d). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

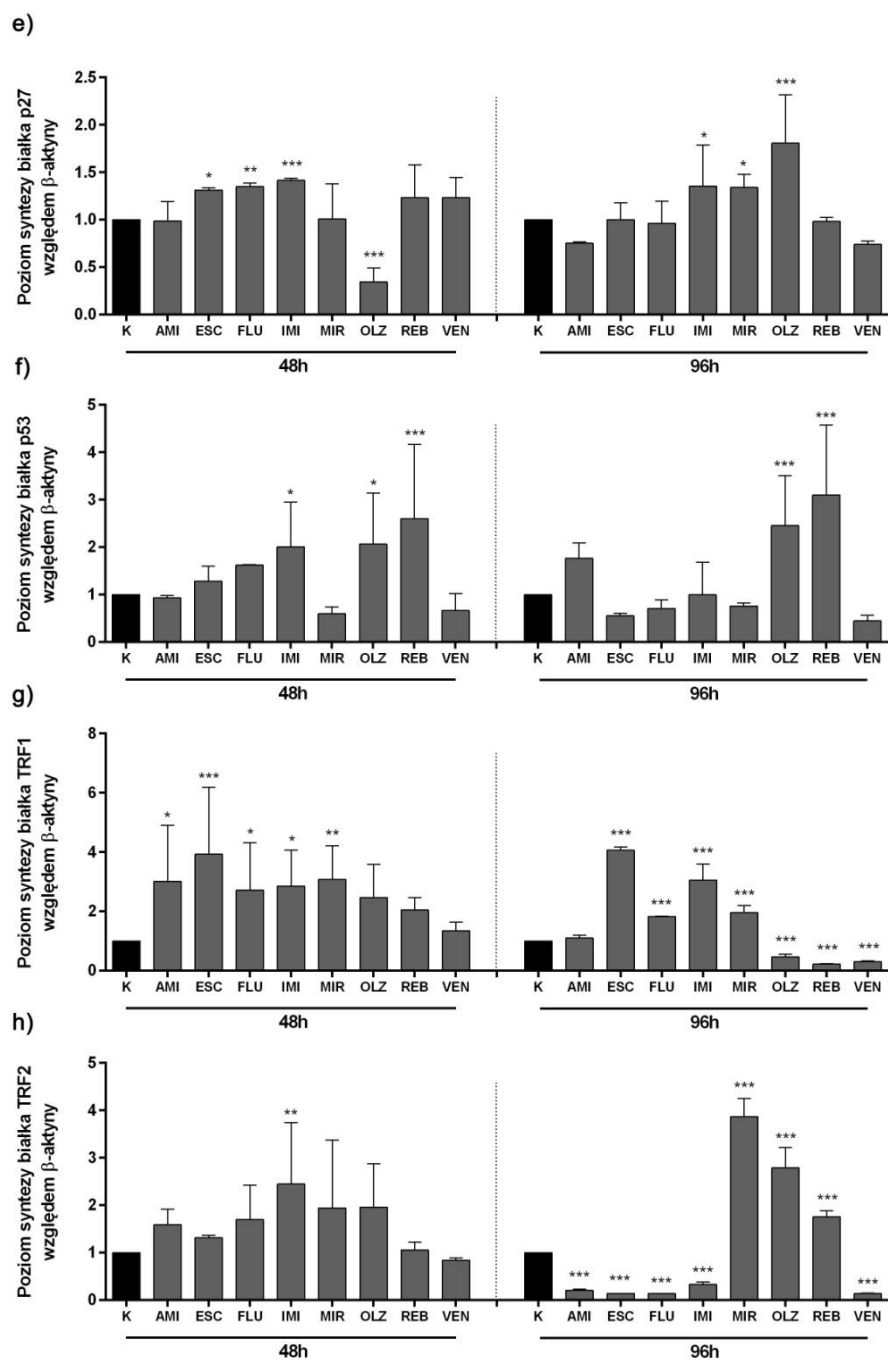


Fig. 4.41. Wartości pomiarów densytometrycznych prążków linii GC-1 spg otrzymanych po chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek: p27 (e), p53 (f), TRF1 (g), TRF2 (h). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

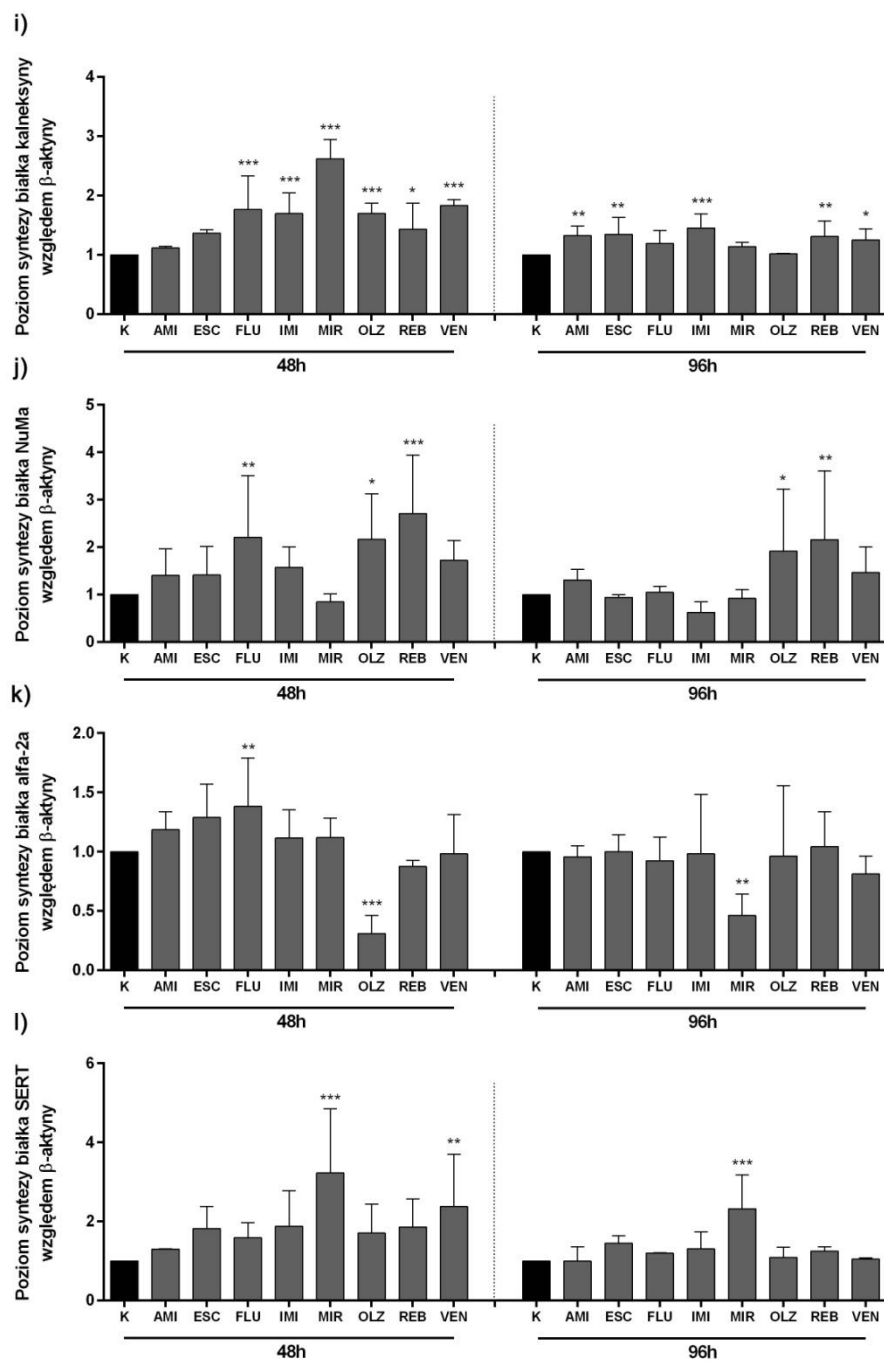


Fig. 4.42. Wartości pomiarów densytometrycznych prążków linii GC-1 spg otrzymanych po chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek: kalneksyna (i), NuMa (j), alfa-2a (k), SERT (l). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

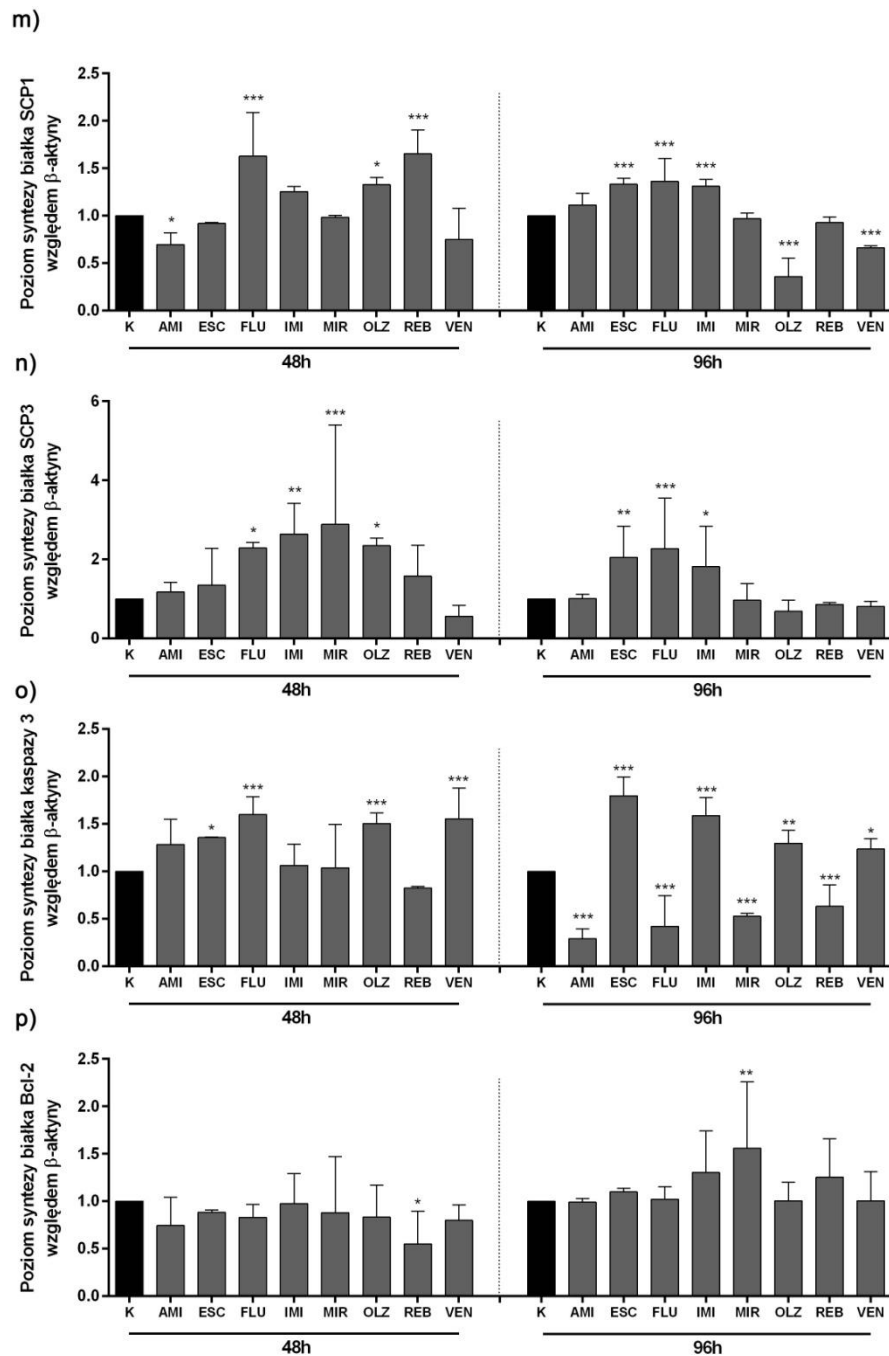


Fig. 4.43. Wartości pomiarów densytometrycznych prążków linii GC-1 spg otrzymanych po chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek: SCP1 (m), SCP3 (n), kaspaza3 (o), Bcl-2 (p). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

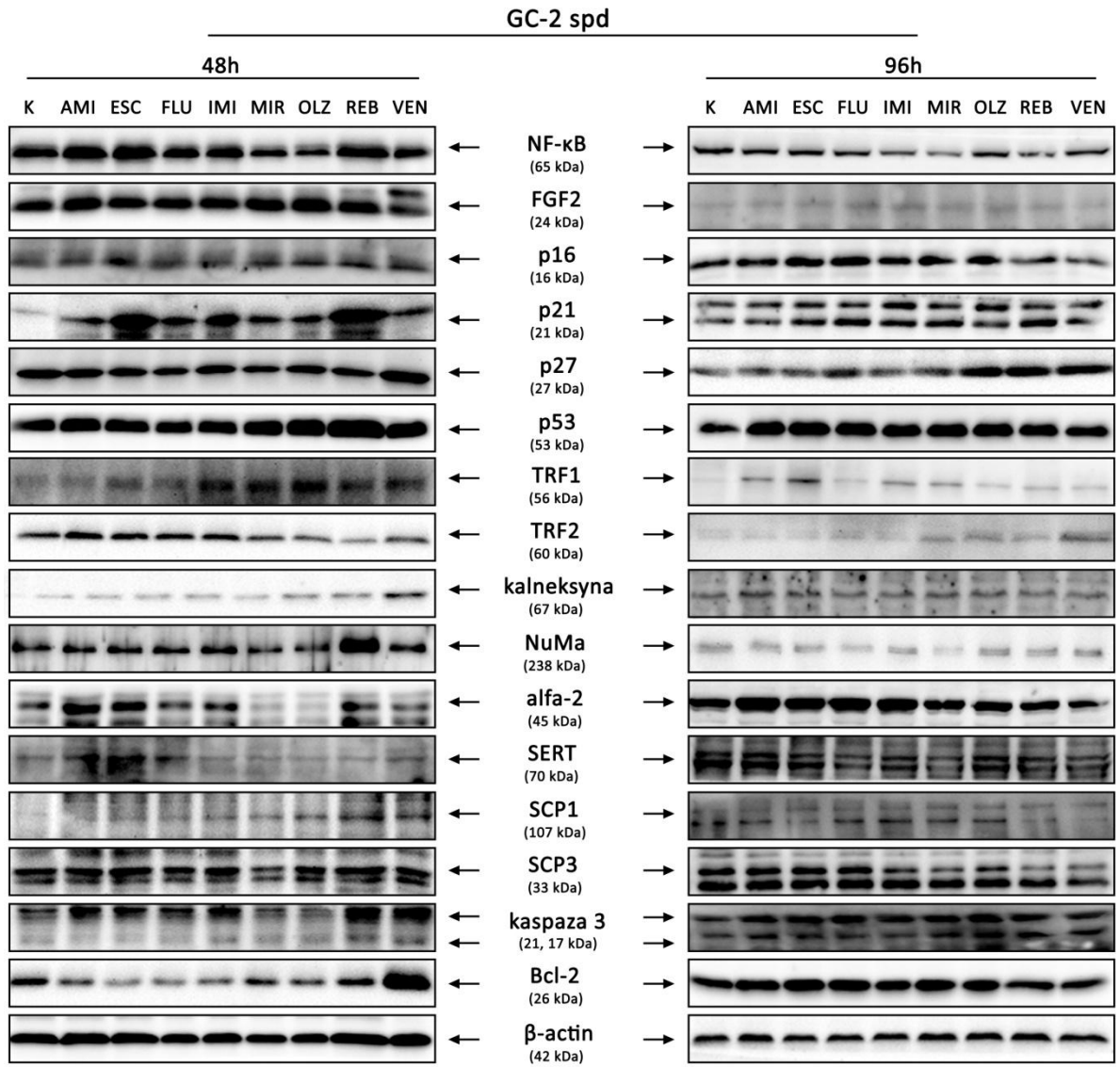


Fig. 4.44. Analiza profilu syntezy białek w komórkach GC-2 spd poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych przez 48h i 96h. Zdjęcia poglądowe ukazujące prążki uzyskane w wykorzystaniu techniki Western Blot.

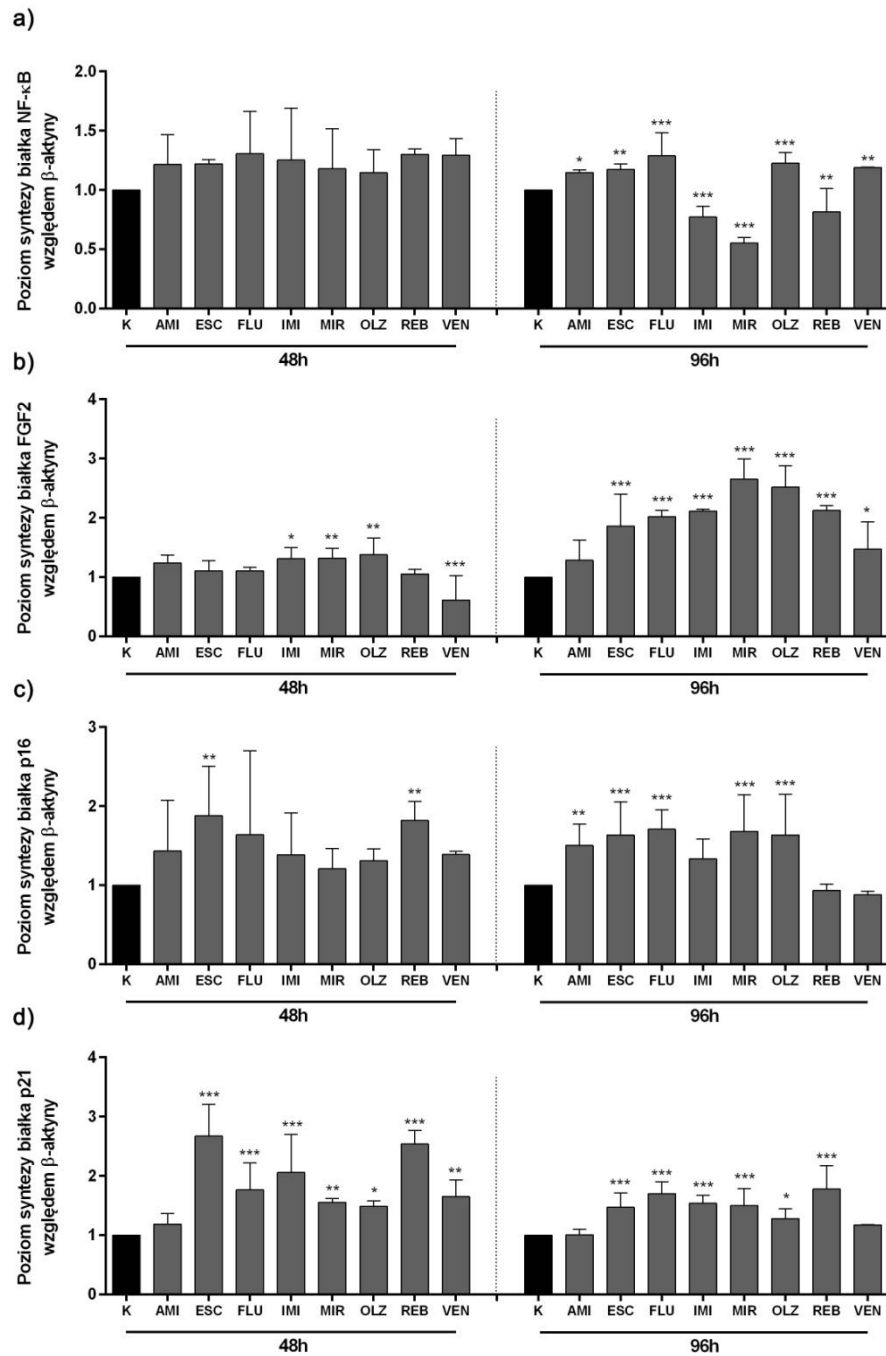


Fig. 4.45. Wartości pomiarów densytometrycznych prążków linii GC-2 spd otrzymanych po chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek: NF-κB (a), FGF2 (b), p16 (c), p21 (d). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

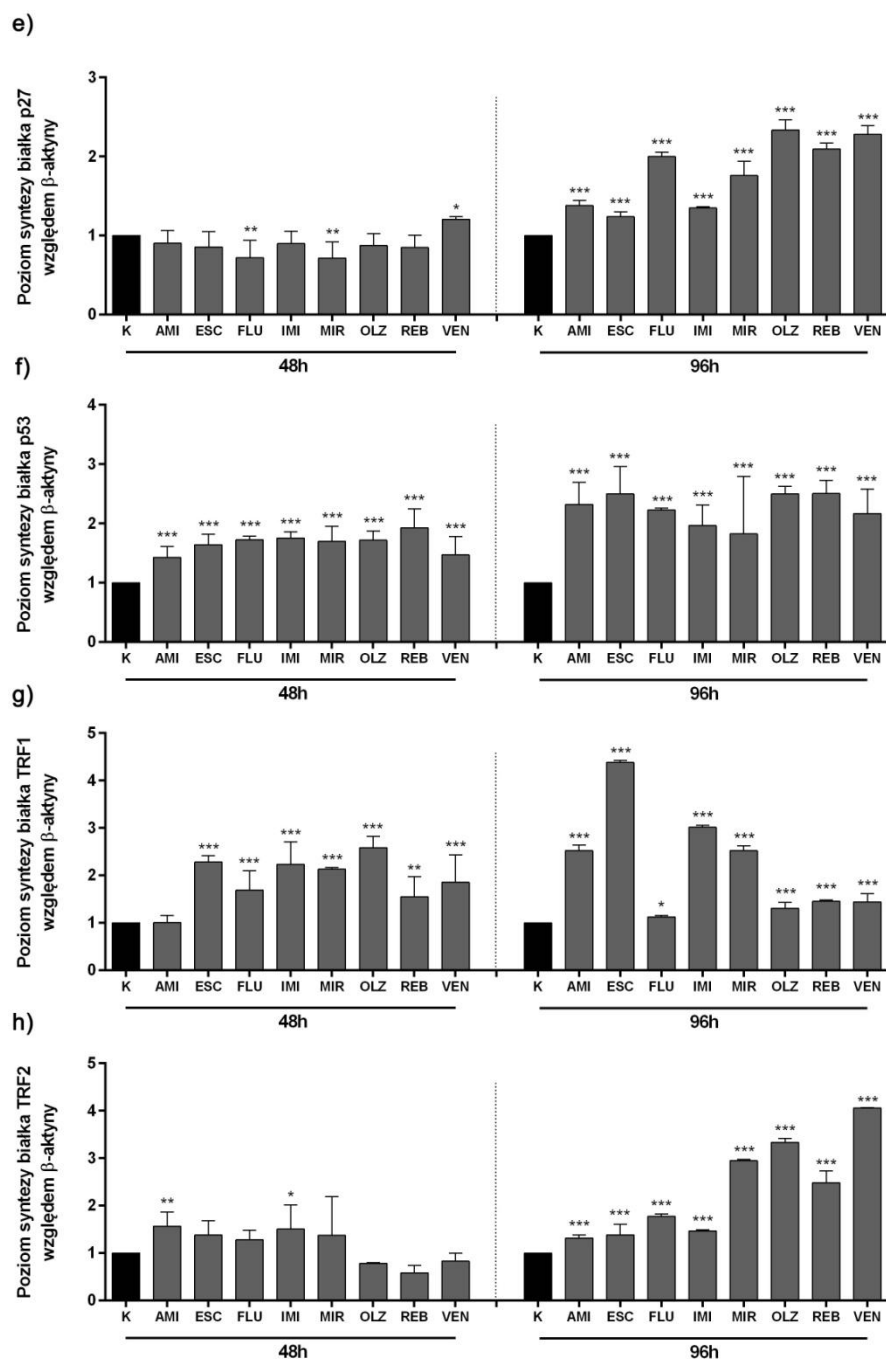


Fig. 4.46. Wartości pomiarów densytometrycznych prążków linii GC-2 spd otrzymanych po chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek: p27 (e), p53 (f), TRF1 (g), TRF2 (h). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

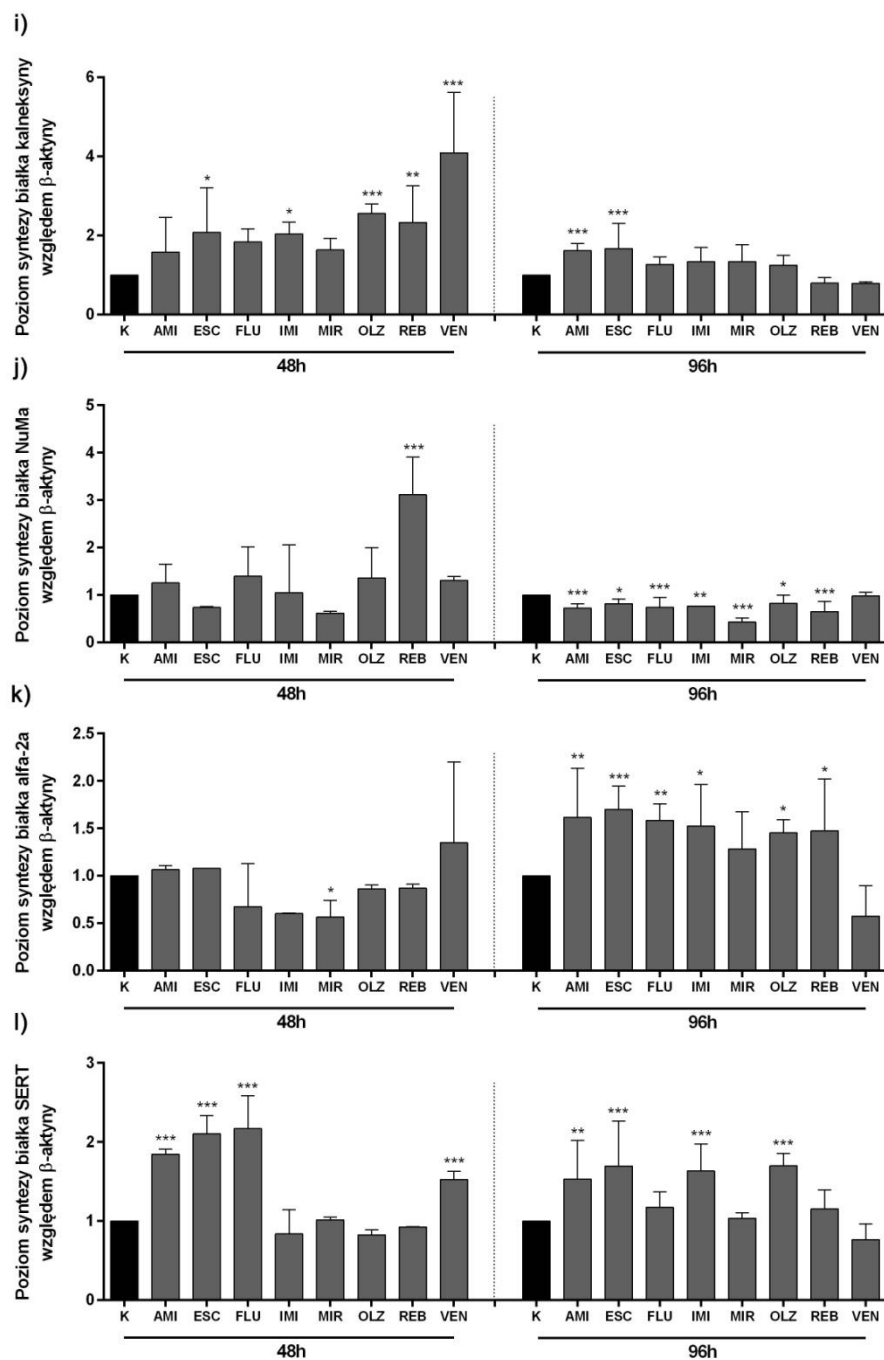


Fig. 4.47. Wartości pomiarów densytometrycznych prążków linii GC-2 spd otrzymanych po chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek: kalneksyna (i), NuMa (j), alfa-2a (k), SERT (l). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

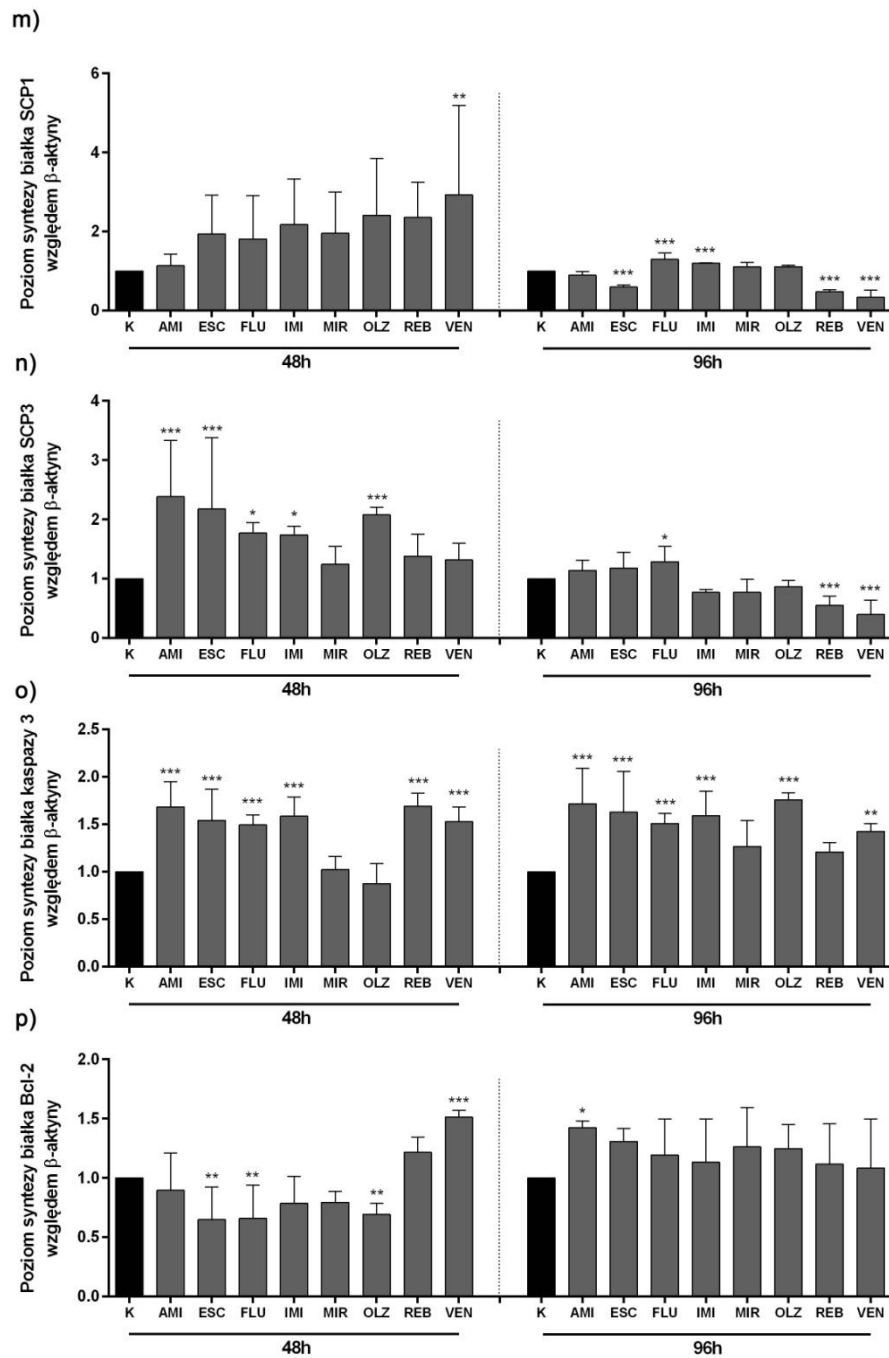


Fig. 4.48. Wartości pomiarów densytometrycznych prążków linii GC-2 spd otrzymanych po chemiluminescencyjnej detekcji badanych białek: SCP1 (m), SCP3 (n), kaspaza3 (o), Bcl-2 (p). Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Tab. 4.4. Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godzinną, a 96-godzinną inkubacją z lekami. Zmienność statystyczną oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości p <0.05 uznano za istotnie statystycznie (^ p< 0.05; ^^ p< 0.01; ^^ ^ p< 0.001).

GC-1 spg																
	NF-κB	FGF2	p16	p21	p27	p53	TRF1	TRF2	kalneksyna	NuMa	alfa-2a	SERT	SCP1	SCP3	kaspaza3	Bcl-2
KON	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMI 10 μM	ns	ns	ns	ns	ns	ns	^^ ^	^^ ^	ns	ns	ns	ns	^^ ^	ns	^^ ^	ns
ESC 30 μM	ns	^^ ^	ns	ns	ns	ns	ns	^^ ^	ns	ns	ns	ns	^^ ^	ns	ns	ns
FLU 5 μM	ns	ns	^^ ^	ns	^^	ns	ns	^^ ^	^^ ^	^	^^	ns	^	ns	^^ ^	ns
IMI 20 μM	ns	ns	ns	ns	ns	^	ns	^^ ^	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MIR 150 μM	ns	ns	^^	^^ ^	^	ns	ns	^^ ^	^^ ^	ns	^^ ^	ns	ns	^^ ^	ns	^^ ^
OLZ 40 μM	ns	ns	^^ ^	^^	^^ ^	ns	^^ ^	^	^^ ^	ns	^^ ^	ns	^^ ^	^^ ^	ns	ns
REB 30 μM	^^	ns	ns	ns	ns	ns	^^	ns	ns	ns	ns	ns	^^ ^	ns	ns	^^ ^
VEN 250 μM	ns	ns	ns	^	^^ ^	ns	ns	ns	^^ ^	ns	ns	^^ ^	ns	ns	ns	ns

GC-2 spd																
	NF-κB	FGF2	p16	p21	p27	p53	TRF1	TRF2	kalneksyna	NuMa	alfa-2a	SERT	SCP1	SCP3	kaspaza3	Bcl-2
KON	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMI 10 μM	ns	ns	ns	ns	^^ ^	^^ ^	^^ ^	ns	ns	ns	^	ns	ns	^^ ^	ns	^^ ^
ESC 30 μM	ns	^^ ^	ns	^^ ^	^^ ^	^^ ^	^^ ^	ns	ns	ns	^^	^	^	^^ ^	ns	^^ ^
FLU 5 μM	ns	^^ ^	ns	ns	^^ ^	^	^^ ^	^^	ns	^^	^^ ^	^^ ^	ns	ns	ns	^^ ^
IMI 20 μM	^^ ^	^^ ^	ns	^^	^^ ^	ns	^^ ^	ns	ns	ns	^^ ^	^^ ^	ns	^^ ^	ns	^
MIR 150 μM	^^ ^	^^ ^	ns	ns	^^ ^	ns	^	^^ ^	ns	ns	^^ ^	ns	ns	ns	ns	^^ ^
OLZ 40 μM	ns	^^ ^	ns	ns	^^ ^	^^ ^	^^ ^	^^ ^	^^ ^	ns	^^	^^ ^	^	^^ ^	^^ ^	^^ ^
REB 30 μM	^^ ^	^^ ^	^^ ^	^^ ^	^^ ^	^^	ns	^^ ^	^^ ^	^^ ^	^^	ns	^^ ^	^^ ^	^^ ^	ns
VEN 250 μM	ns	^^ ^	ns	^^	^^ ^	^^ ^	^^	^^ ^	^^ ^	ns	^^ ^	^^ ^	^^ ^	^^ ^	ns	^^

Porównanie poziomu syntezy analizowanych białek po 48-godzinnej i 96-godzinnej hodowli komórek w obecności leków przeciwdepresyjnych wykazało, że w przypadku linii komórkowej GC-1 spg dłuższy czas inkubacji wpływa istotnie statystycznie na zmianę profilu syntezy w 41 układach (ilość analizowanych białek x ilość układów eksperymentalnych), podczas gdy w przypadku linii komórkowej GC-2 taką zmianę odnotowano w przypadku 78 układów.

4.8. Ocena fragmentacji DNA komórkowego

Kolejnym markerem zaprogramowanej śmierci komórkowej jest ocena fragmentacji końców 3' cząsteczki DNA zachodzących podczas apoptotycznej śmierci komórkowej. Zastosowanie techniki TUNEL umożliwiło wizualizację komórek TUNEL+ oznaczających komórki apoptotyczne. Odnotowano wzrost komórek TUNEL+ we wszystkich układach eksperymentalnych, niezależnie od czasu ekspozycji. Dodatkowo, wraz z upływem czasu liczba komórek apoptotycznych rosła (obie badane linie). Najwyższą ich liczbę odnotowano dla leków ESC, FLU oraz VEN we wszystkich układach eksperymentalnych. Jedynie leki MIR oraz częściowo REB charakteryzowały się odsetkiem komórek TUNEL+ na granicy kontroli (Fig. 4.49.-4.52.).

Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godzinną, a 96-godzinną inkubacją z lekami w kontekście zmian w ilości komórek apoptotycznych podano poniżej w Tab. 4.5.

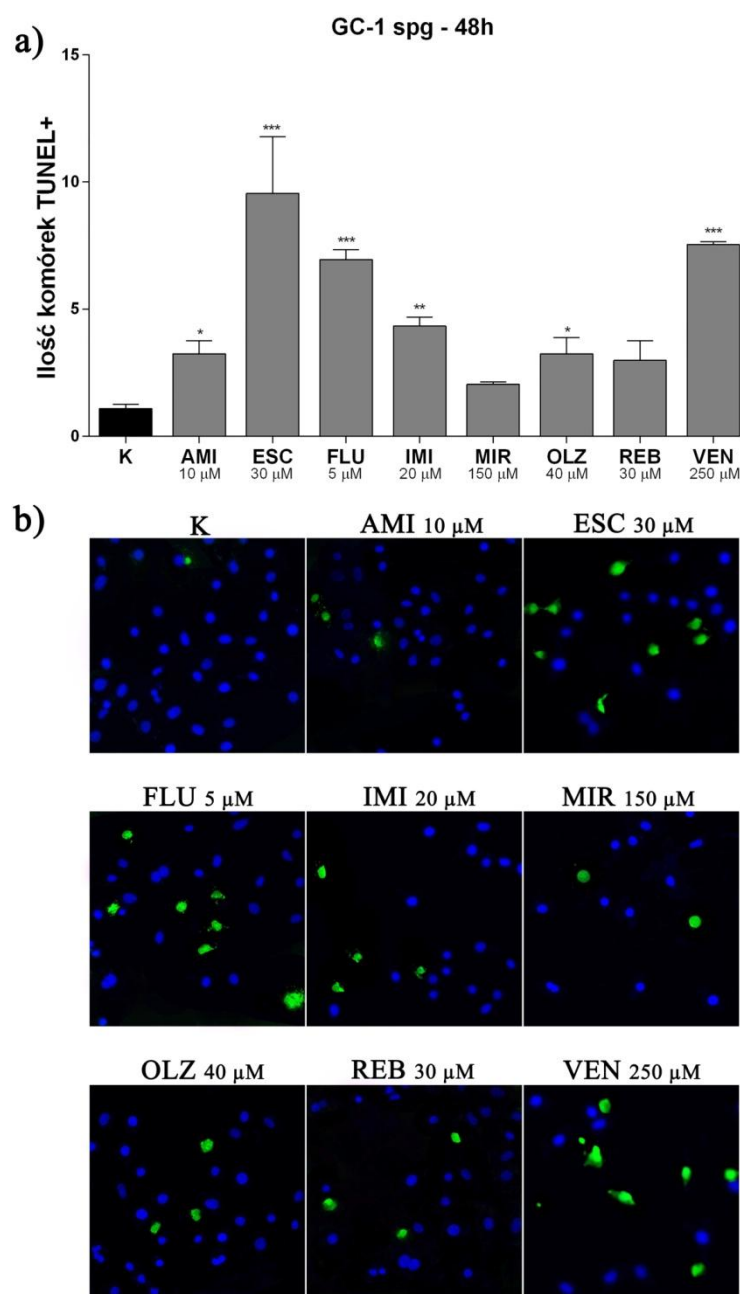


Fig. 4.49. Fragmentacja DNA komórek linii GC-1 spg po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą metody TUNEL. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times). Niebieska fluorescencja (DAPI) komórki żywe, zielona fluorescencja (FITC) komórki apoptotyczne.

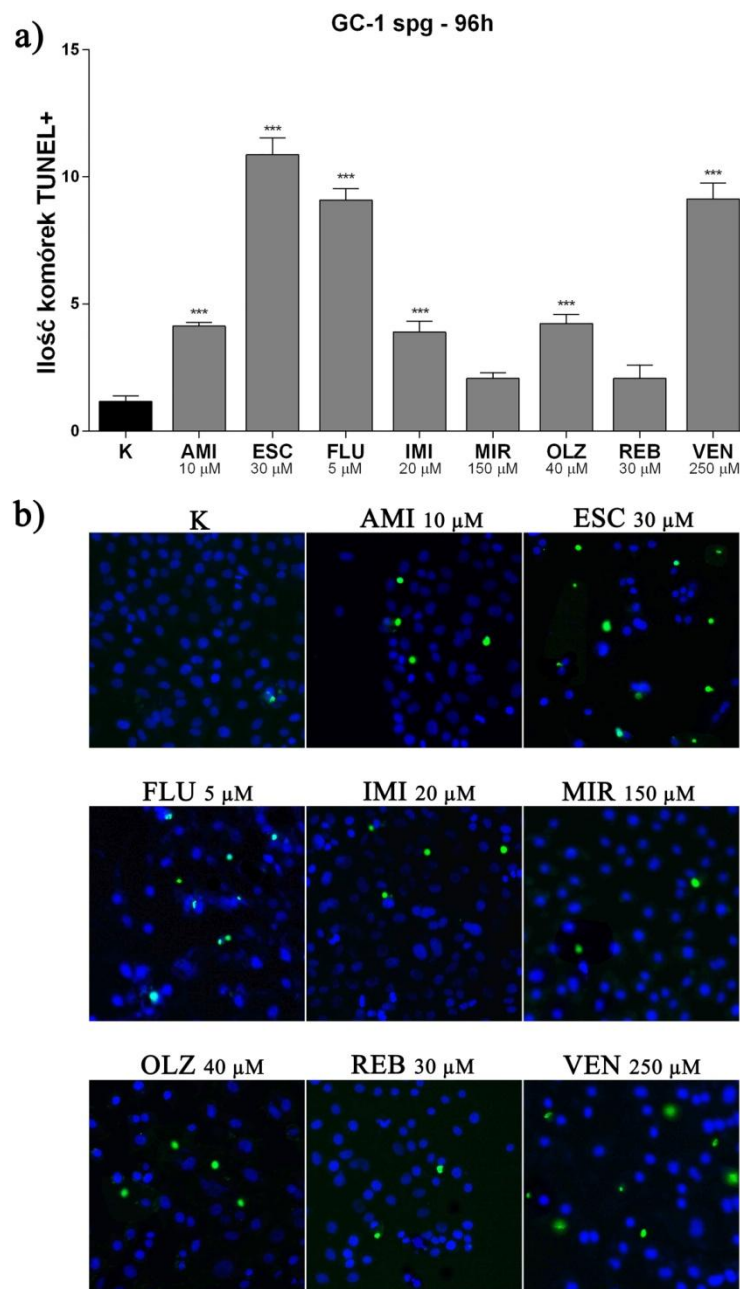


Fig. 4.50. Fragmentacja DNA komórek linii GC-1 spg po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą metody TUNEL. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (***) $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times). Niebieska fluorescencja (DAPI) komórki żywe, zielona fluorescencja (FITC) komórki apoptotyczne.

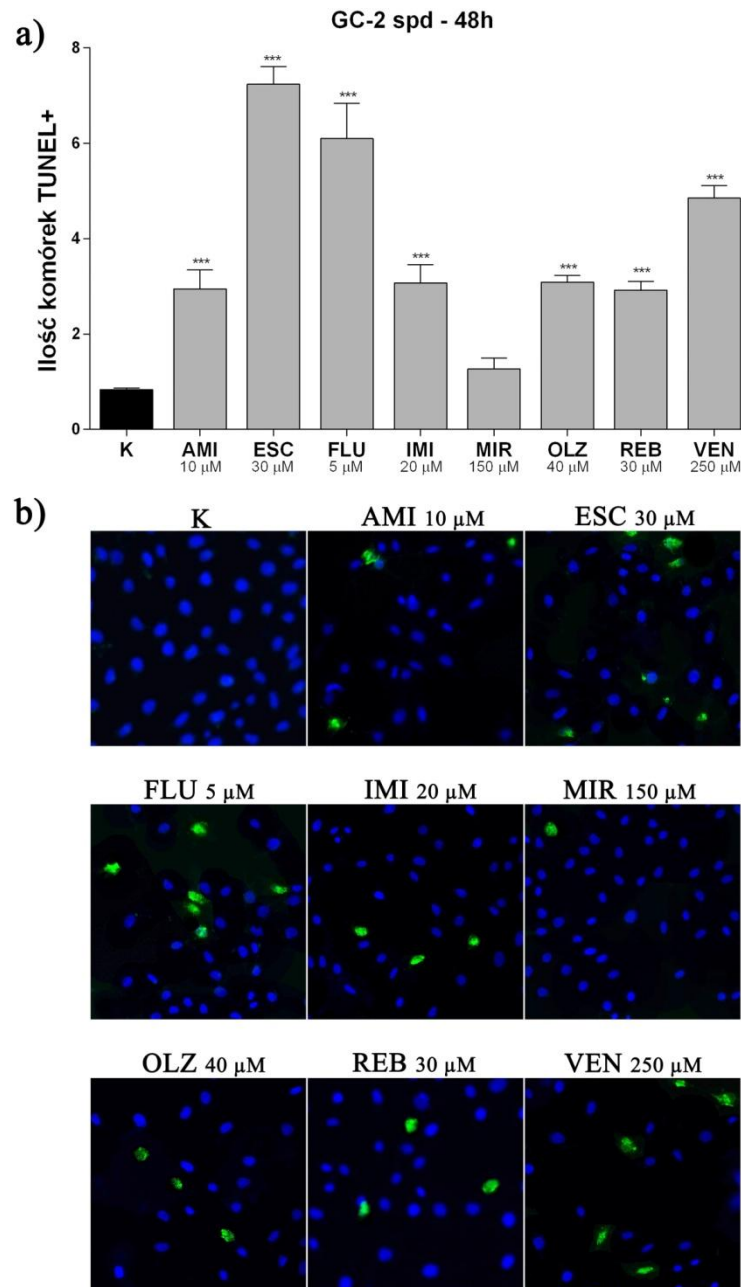


Fig. 4.51. Fragmentacja DNA komórek linii GC-2 spd po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą metody TUNEL. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (***) $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times). Niebieska fluorescencja (DAPI) komórki żywe, zielona fluorescencja (FITC) komórki apoptotyczne.

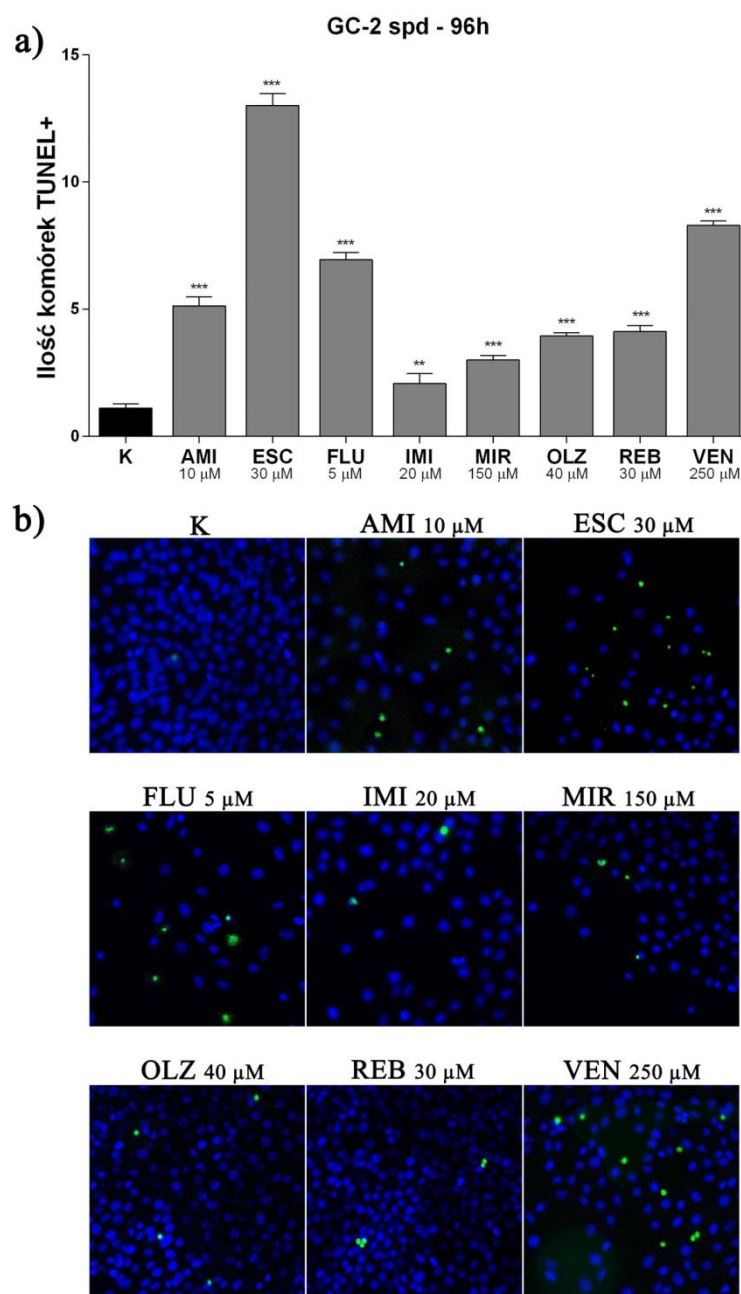


Fig. 4.52. Fragmentacja DNA komórek linii GC-2 spd po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą metody TUNEL. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times). Niebieska fluorescencja (DAPI) komórki żywe, zielona fluorescencja (FITC) komórki apoptotyczne.

4.8. Ocena śmierci komórkowej za pomocą barwienia różnicowego

Końcowym eksperymentem było jednoznacznie wykazanie śmierci komórkowej na skutek ekspozycji badanych linii komórkowych na leki przeciwdepresyjne. W tym celu wykonano dwie techniki na potwierdzenie uzyskanych wyników: 1) barwienie różnicowe bromek etydyny/oranż akrydyny oraz 2) barwienie z wykorzystaniem kalceina-AM / jodek propidyny (Calcein-AM/PI).

Zaobserwowano istotny spadek żywotności komórek już po 48h inkubacji z badanymi lekami dla linii komórek GC-1 spg. Efekt był jeszcze bardziej widoczny po 96h ekspozycji. Z kolei linia komórek GC-2 spd charakteryzowała się większą odpornością i tym samym mniejszym odsetkiem martwych komórek po 48h. Co interesujące, po 96h inkubacji również w przypadku tej linii obserwowano znaczne spadki żywotności we wszystkich układach eksperymentalnych (Fig. 4.53.-4.56.). Analogiczne rezultaty otrzymano stosując drugą technikę barwienia. W tym wypadku liczba martwych komórek rosła wraz z upływem czasu hodowli we wszystkich badanych układach (Fig. 4.57.-4.60.).

Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godziną, a 96-godziną inkubacją z lekami dla oceny żywotności komórek podano poniżej w Tab. 4.5.

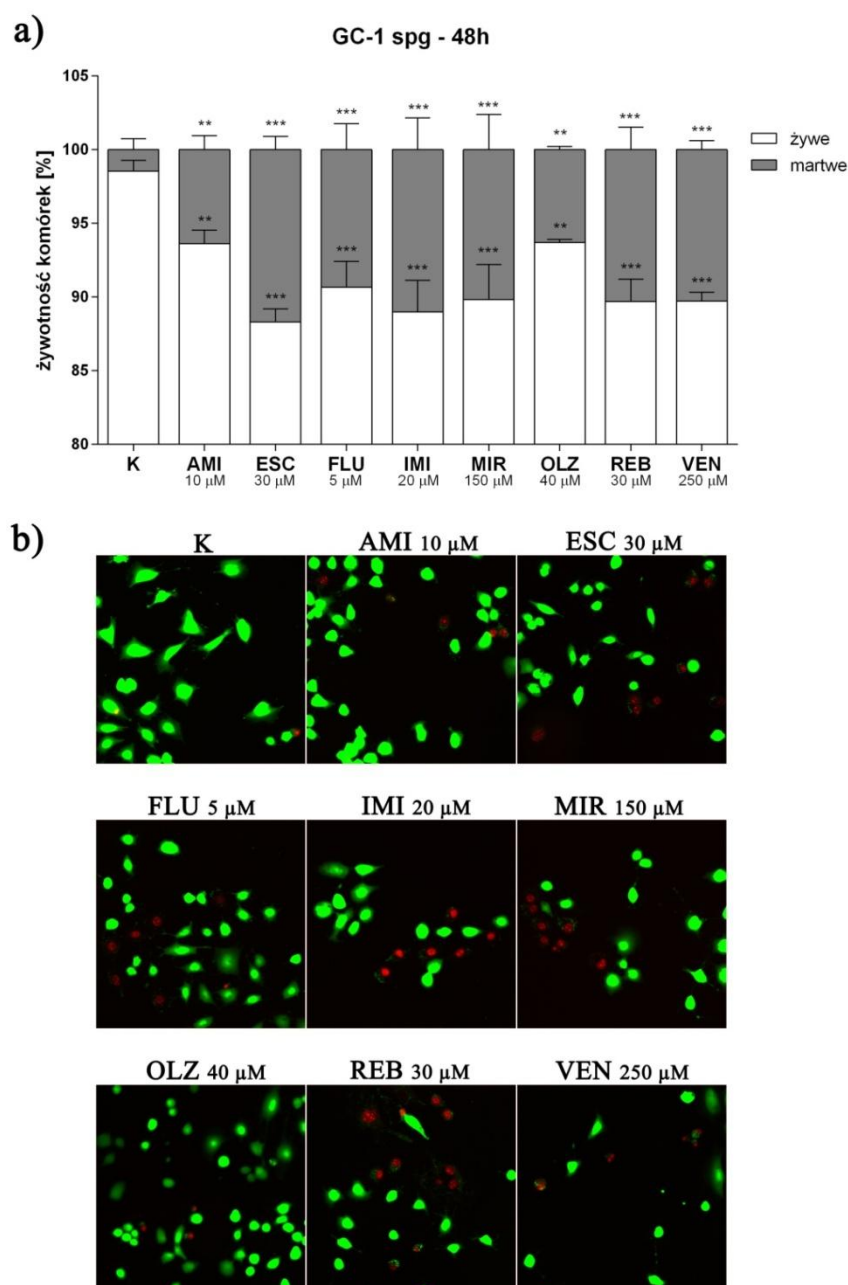


Fig. 4.53. Żywność komórek linii GC-1 spg po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą barwienia kalceina/PI. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times). Zielona fluorescencja (FITC) komórki żywe, czerwona fluorescencja (Texas Red) komórki martwe.

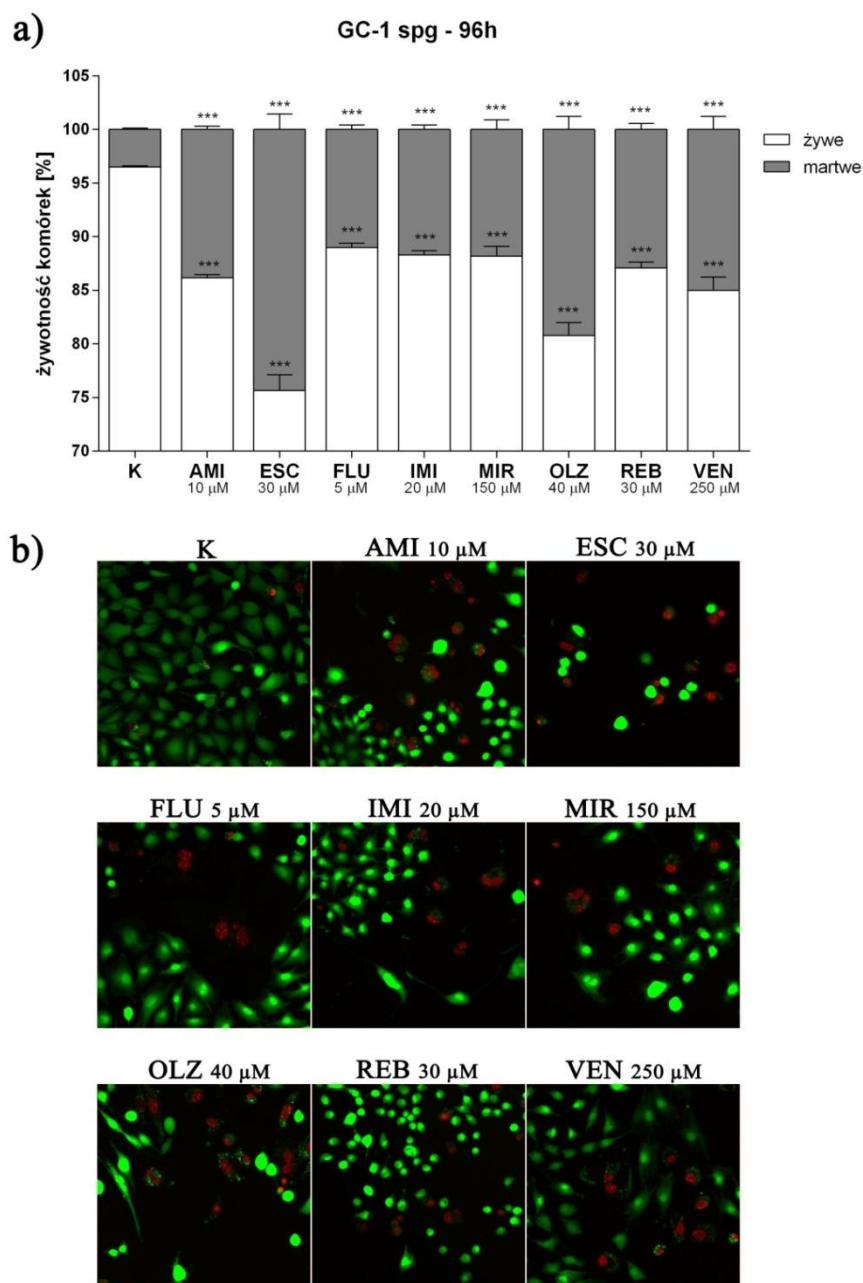


Fig. 4.54. Żywotność komórek linii GC-1 spg po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą barwienia kalceina/PI. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (***) $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times). Zielona fluorescencja (FITC) komórki żywe, czerwona fluorescencja (Texas Red) komórki martwe.

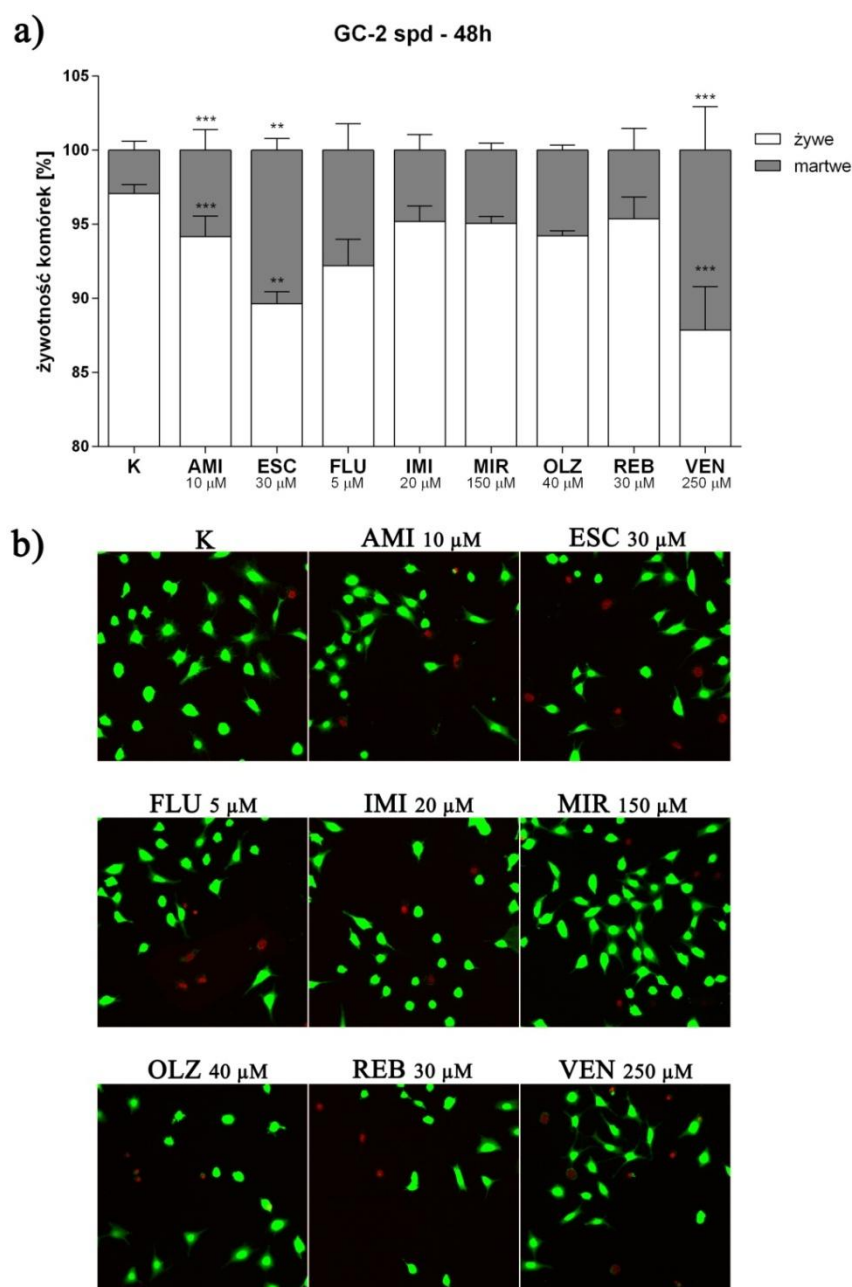


Fig. 4.55. Żywotność komórek linii GC-2 spd po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą barwienia kalceina/PI. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times). Zielona fluorescencja (FITC) komórki żywe, czerwona fluorescencja (Texas Red) komórki martwe.

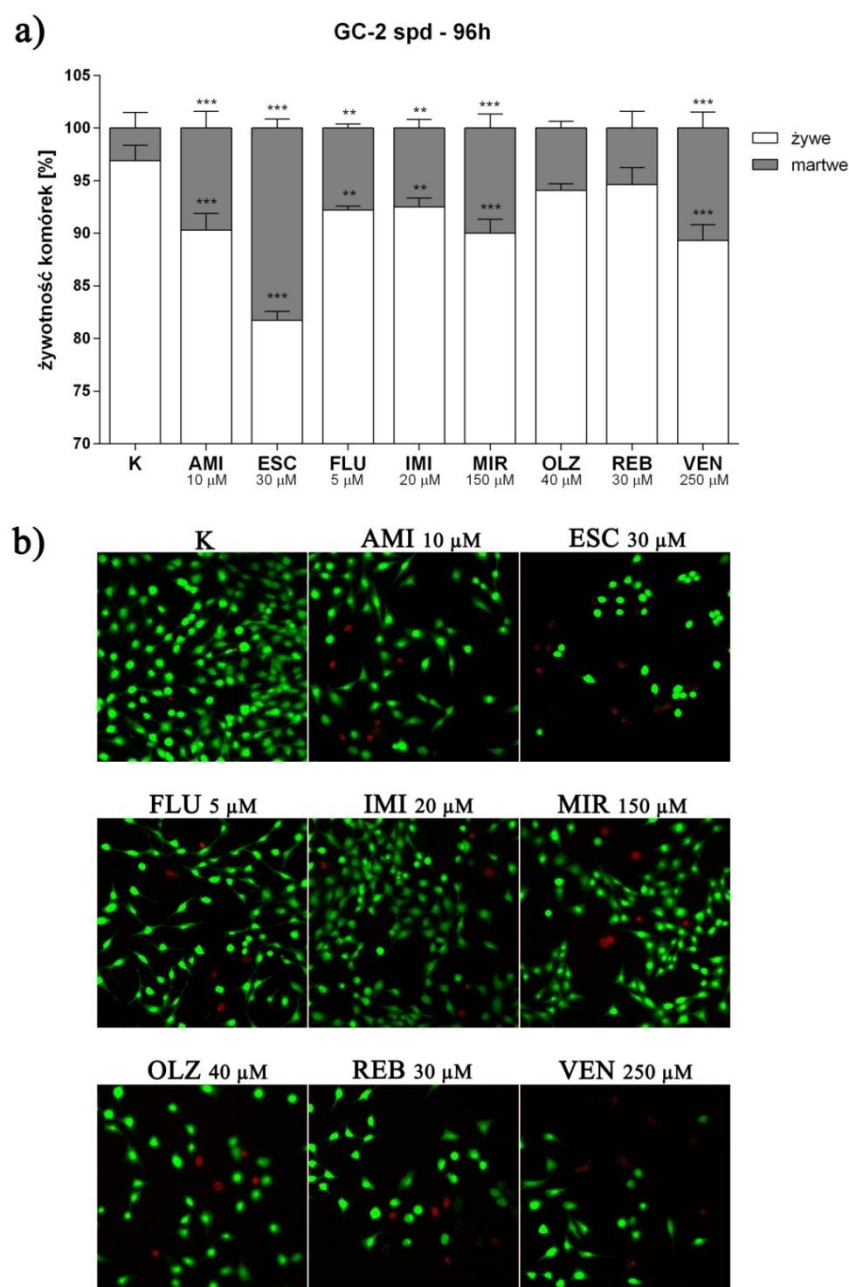


Fig. 4.56. Żywotność komórek linii GC-2 spd po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą barwienia kalceina/PI. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times). Zielona fluorescencja (FITC) komórki żywe, czerwona fluorescencja (Texas Red) komórki martwe.

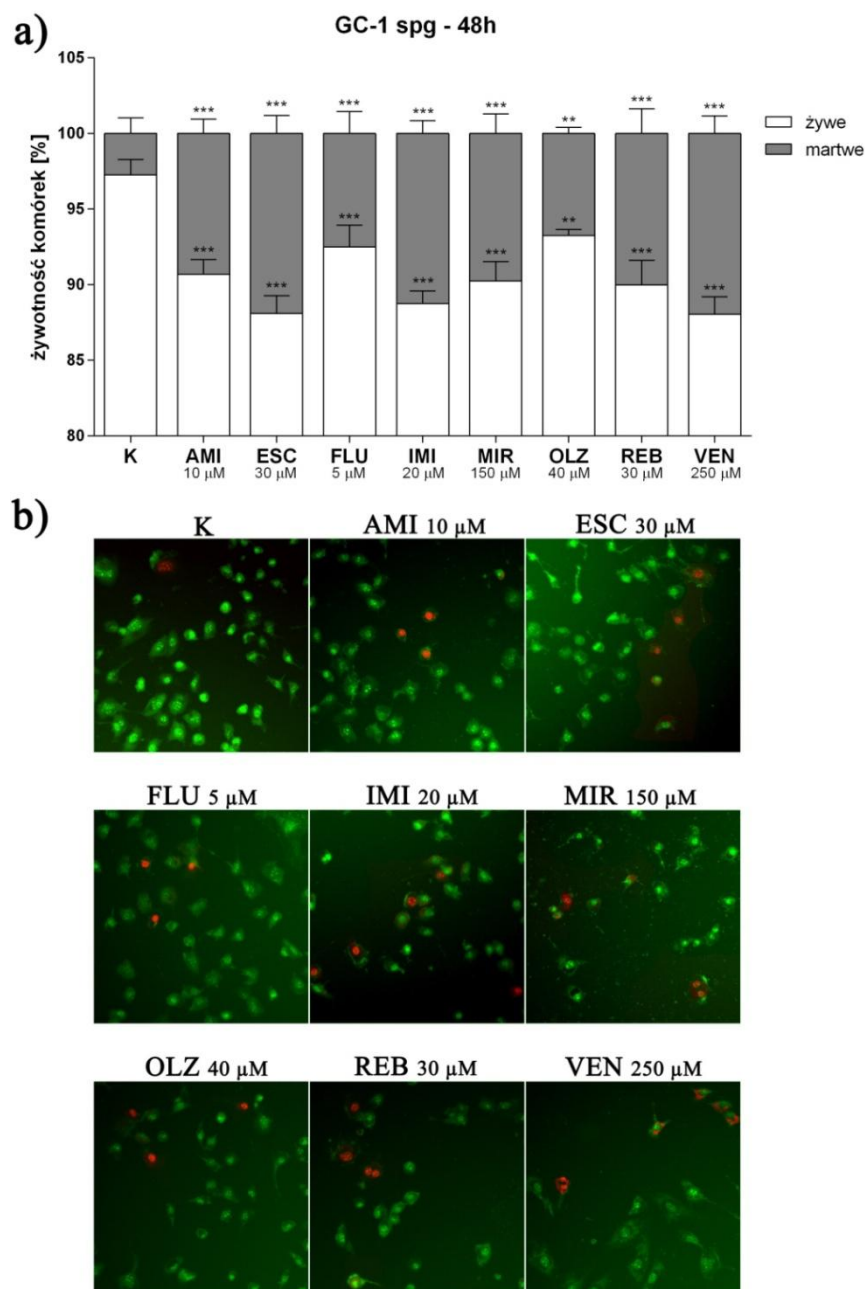


Fig. 4.57. Żywotność komórek linii GC-1 spg po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą barwienia EtBr/OA. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times). Zielona fluorescencja (FITC) komórki żywe, czerwona fluorescencja (Texas Red) komórki martwe.

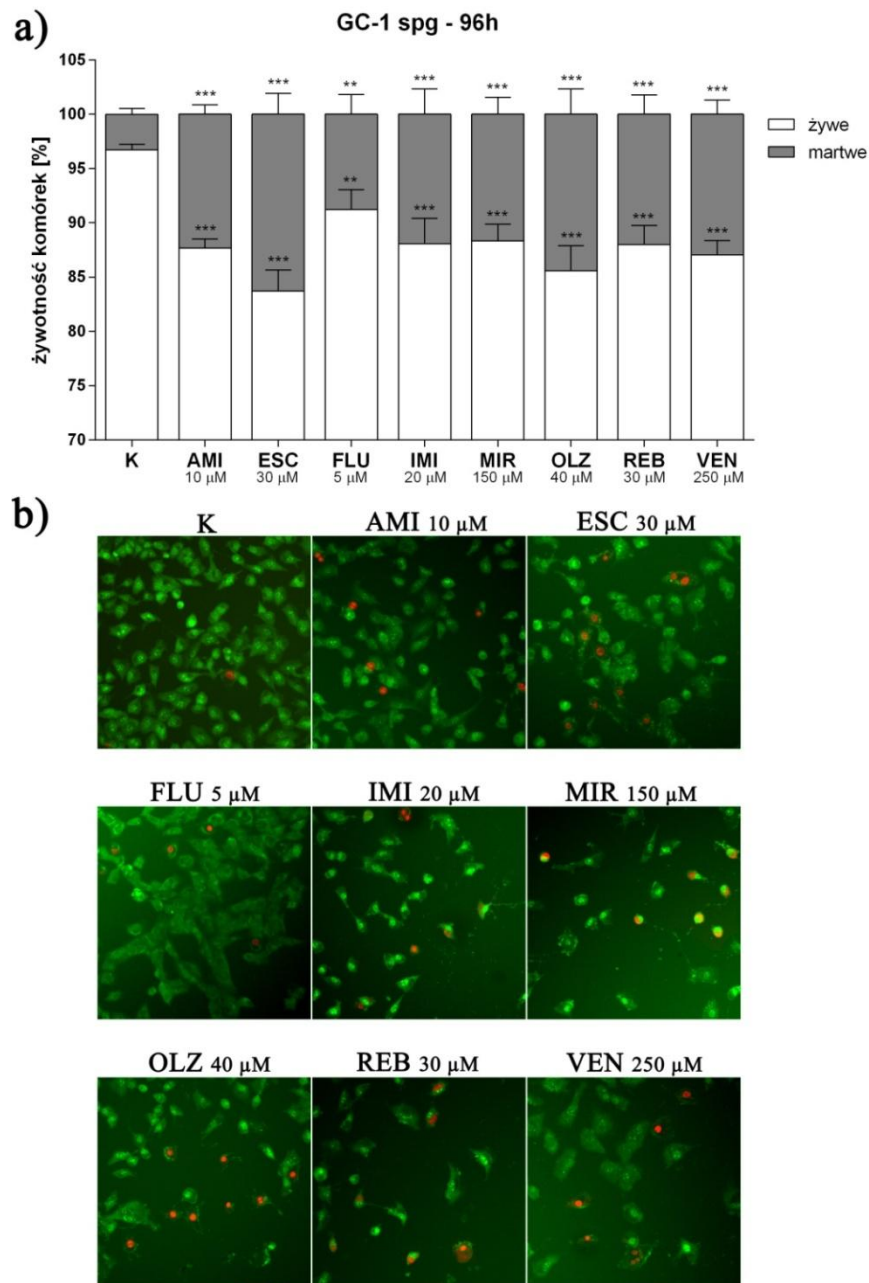


Fig. 4.58. Żywotność komórek linii GC-1 spg po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą barwienia EtBr/OA. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-1 spg poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times). Zielona fluorescencja (FITC) komórki żywe, czerwona fluorescencja (Texas Red) komórki martwe.

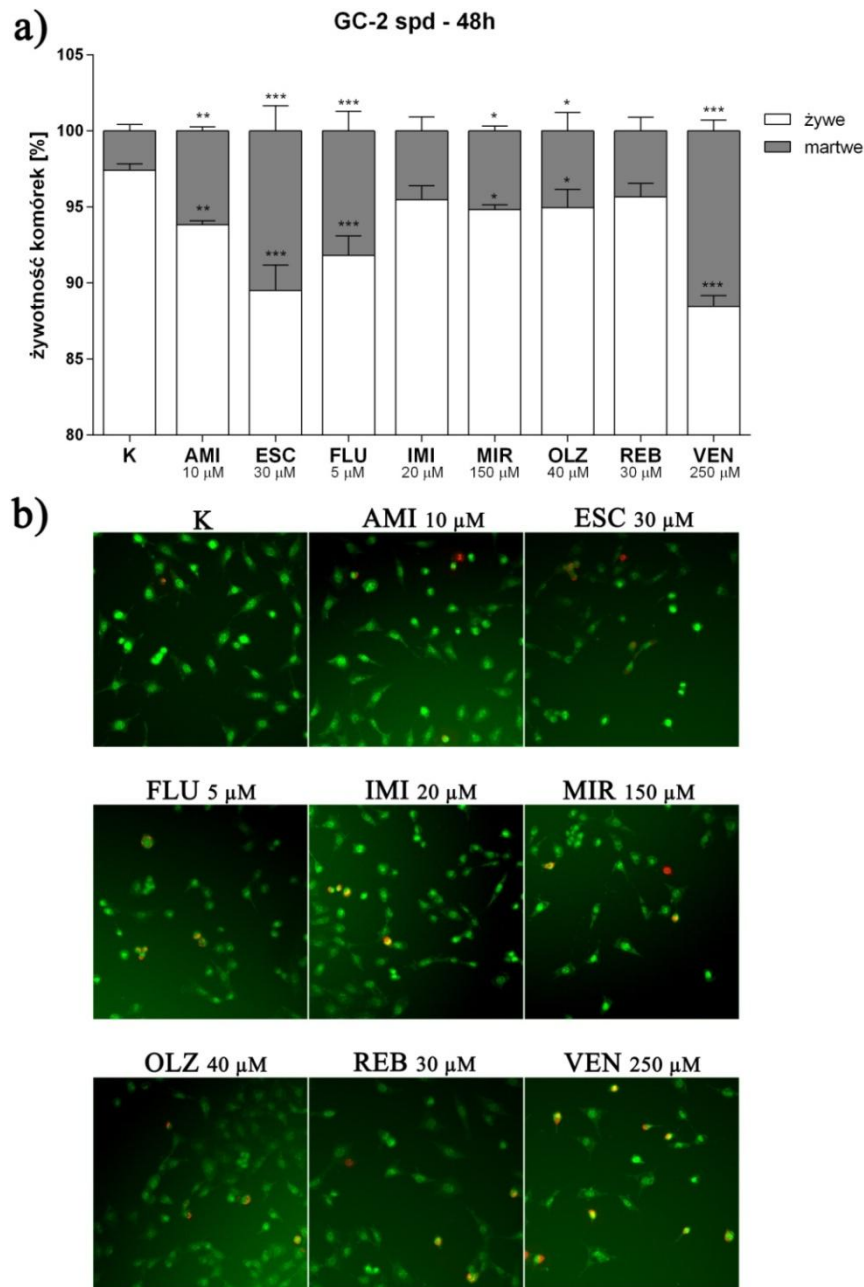


Fig. 4.59. Żywotność komórek linii GC-2 spd po 48h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą barwienia EtBr/OA. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 48h (b) (powiększenie 10 \times). Zielona fluorescencja (FITC) komórki żywe, czerwona fluorescencja (Texas Red) komórki martwe.

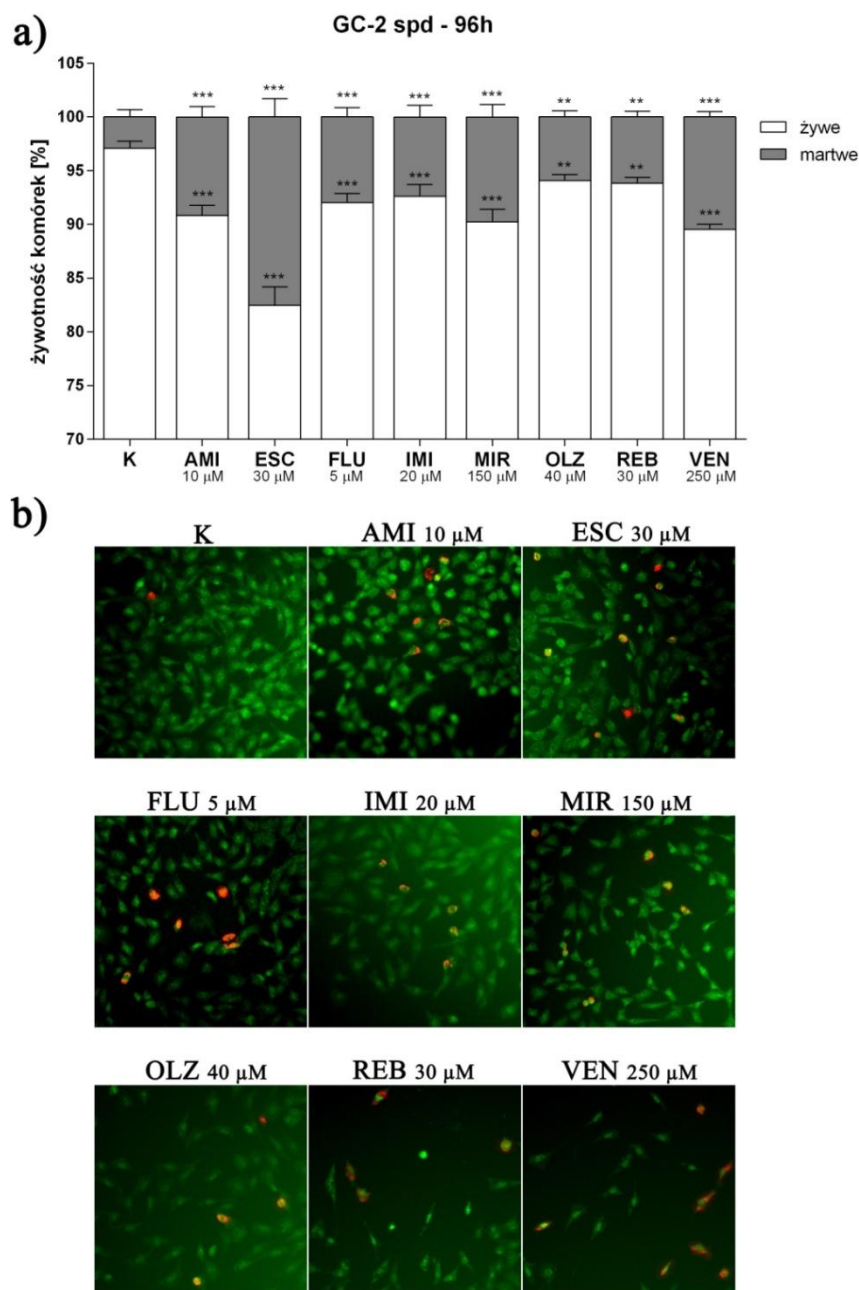


Fig. 4.60. Żywność komórek linii GC-2 spd po 96h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi wykryta za pomocą barwienia EtBr/OA. Wyniki przedstawiają wartości z 3 biologicznych powtórzeń oraz 3 technicznie niezależnych eksperymentów i wyrażone w postaci $X \pm SD$ ($n=3 \times 3$) (a). Różnice statystyczne oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reprezentatywne zdjęcia komórek linii GC-2 spd poddanych działaniu leków przez okres 96h (b) (powiększenie 10 \times). Zielona fluorescencja (FITC) komórki żywe, czerwona fluorescencja (Texas Red) komórki martwe.

Tab. 4.5. Zestawienie różnic statystycznych pomiędzy 48-godziną, a 96-godziną inkubacją z lekami. Zmienność statystyczną oznaczono przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Wartości $p < 0.05$ uznano za istotnie statystycznie ($^{\wedge}$ $p < 0.05$; $^{\wedge\wedge}$ $p < 0.01$; $^{\wedge\wedge\wedge}$ $p < 0.001$).

	GC-1 spg					GC-2 spd				
	TUNEL	kalceina/PI		EtBr/OA		TUNEL	kalceina/PI		EtBr/OA	
		żywe	martwe	żywe	martwe		żywe	martwe	żywe	martwe
KON	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMI 10 μ M	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	ns	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge}$	$^{\wedge}$	$^{\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge}$
ESC 30 μ M	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$
FLU 5 μ M	$^{\wedge\wedge}$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IMI 20 μ M	ns	ns	ns	ns	ns	$^{\wedge}$	ns	ns	$^{\wedge}$	$^{\wedge}$
MIR 150 μ M	ns	ns	ns	ns	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$
OLZ 40 μ M	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge}$	ns	ns	ns	ns
REB 30 μ M	ns	ns	ns	ns	ns	$^{\wedge\wedge}$	ns	ns	ns	ns
VEN 250 μ M	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	$^{\wedge\wedge\wedge}$	ns	ns	$^{\wedge\wedge\wedge}$	ns	ns	ns	ns

Na podstawie porównania wyników pomiędzy 48, a 96 godziną ekspozycją na leki odnotowano wzrost w stosunku do ilości komórek apoptotycznych (TUNEL+) tylko w jednym układzie linii GC-1 spg (FLU). Zupełnie przeciwnie prezentowały się wyniki układów eksperymentalnych komórek linii GC-2 spd gdzie liczba komórek TUNEL+ wszędzie wzrastała (z wyłączeniem FLU).

Analiza wyników barwienia różnicowego komórki martwe/żywe (metoda kalceina/PI oraz EtBr/OA) wykazała wzrost ilości martwych komórek wraz z czasem trwania hodowli. Największy odsetek komórek martwych po 96h inkubacji w stosunku do hodowli krótkoterminowej obserwowano w układach leków AMI, ESC, OLZ, VEN (linia GC-1 spg) oraz AMI, ESC, MIR (linia GC-2 spd).

5. Dyskusja

Zaburzenia depresyjne są problemem o zasięgu globalnym, szczególnie w krajach wysokorozwiniętych. Obecnie dostępne kliniczne leki przeciwdepresyjne stanowią niejednorodną grupę pod względem budowy chemicznej i mechanizmów działania. Samo leczenie farmakologiczne jest długotrwałe, często mało skuteczne i towarzyszy mu szereg objawów niepożądanych, w tym zaburzenia seksualne, co może być jednym z ważniejszych powodów przedwczesnego przerwania leczenia [6, 34, 68]. Niemniej jednak, w dostępnym piśmiennictwie stosunkowo niewiele prac dotyczy wpływu leków przeciwdepresyjnych na procesy rozrodcze, stąd konieczność określenia molekularnych mechanizmów i skutków ich działania na spermatoocyty I rzędu uzasadniało w naszej opinii prowadzenie badań w tym zakresie.

W trakcie prowadzenia badań w ramach niniejszej pracy wykorzystano dwie komercyjne linie komórkowe jako model eksperymentalny procesu mejozy *in vitro* (linie komórkowe GC-1 spg, GC-2 spd). Do badań wybrano 8 leków przeciwdepresyjnych, które oprócz wpływu na centralny układ nerwowy (głównie struktury mózgowe) mogą również wywierać wiele efektów ubocznych na tkanki obwodowe. Dane piśmiennictwa jednoznacznie wskazują, że komórki generatywne w porównaniu do komórek somatycznych wydają się być zaskakująco odporne na indukowane uszkodzenia DNA. To właśnie ta cecha sprawia, że mogą być przydatne do lepszego zrozumienia skutków ubocznych działania leków, w tym leków przeciwdepresyjnych o różnych mechanizmach działania. Dodatkowo, zastosowane hodowle komórkowe *in vitro* umożliwiają generowanie powtarzalnych wyników, co jest niezbędne w określaniu bezpiecznych i skutecznych terapeutyków [69].

Potencjalny wpływ badanych substancji na komórki uzależniony może być od kilku czynników. W tym przypadku, jednym z takich czynników jest obecność w testowanych komórkach receptorów dla analizowanych leków

przeciwdepresyjnych. Dotychczasowe badania Mhaouty-Kodja i wsp. (2007) wykazały obecność receptorów adrenergicznych w komórkach spermatocytów, jednakże brak jest jakichkolwiek informacji na temat obecności w ich strukturze transporterów białkowych serotoniny [70]. Z kolei receptory serotoniny zostały zidentyfikowane w jądrach [70, 71], najądrzach [72], komórkach Sertoliego [73] oraz Leydiga [74], gdzie odgrywają ważną funkcję w regulacji przepływu krwi, dojrzewaniu plemników oraz pośredniczą w syntezie testosteronu. Warto podkreślić, że to właśnie brak lub nadmiar serotoniny może prowadzić do bezpośredniego pogorszenia parametrów nasienia [75, 76].

W trakcie badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej potwierdzono obecność receptorów dla działania leków przeciwdepresyjnych na komórkach spermatocytów I rzędu tj. receptorów alfa-2-adrenergicznych oraz transporterów białkowych serotoniny zarówno w tkankach jąder szczura oraz w komórkach linii GC-1 spg oraz GC-2 spd. Analiza histologiczna potwierdziła prawidłową strukturę analizowanych tkanek (u szczurów nie poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych). Dane piśmiennictwa potwierdzają, że na podstawie badania histologicznego tkanki jądra można dokonać również oceny toksyczności leków przeciwdepresyjnych w odniesieniu do prawidłowego przebiegu spermatogenezy. Proces rozpoczyna się w kanalikach nasiennych jąder i jest regulowany przez różne czynniki znajdujące się w otaczającym je środowisku. Oznacza to, że również leki mogą mieć na niego bezpośredni i prawdopodobnie negatywny wpływ [77, 78]. W piśmiennictwie dostępne są jedynie nieliczne dane dotyczące badania histologicznego tkanki jąder szczura po ekspozycji na leki przeciwdepresyjne. Odnotowano zaburzenia tego procesu przy stosowaniu wysokich dawek klomipraminy (pochodnej imipraminy). Prawdopodobną bezpośrednią przyczyną zaburzeń mogło być znaczne podniesienie poziomu hormonów regulujących proces dojrzewania męskich komórek płciowych [24]. Wyniki badań wskazują również na niekorzystne zmiany w strukturze tkanki jąder u zwierząt poddanych działaniu fluoksetyny tj. zmniejszenie masy jąder (16%), najądrzy (28%), pęcherzyków nasiennych (18%), redukcję liczby komórek Leydiga (30%), obniżenie dziennej produkcji plemników (18%), zniekształcenie kanalików nasiennych oraz postępujące zmiany morfologiczne komórek zarodkowych [79, 80].

Kontynuując, stwierdzenie obecności w testowanych liniach komórkowych receptorów dla leków przeciwdepresyjnych potwierdziło, że leki te mogą wywierać na komórki bezpośredni wpływ, a wybrane linie komórkowe stanowią bardzo dobry model dla zaplanowanych eksperymentów. W celu oceny potencjalnych efektów wykonano szereg testów określających cyto- i genotoksyczność leków przeciwdepresyjnych w hodowlach *in vitro* spermatocytów. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na bezpośrednią zależność spadku potencjału proliferacyjnego i aktywności metabolicznej komórek od stężenia substancji i czasu inkubacji, niezależnie od rodzaju badanego związku oraz linii komórkowej. Co więcej, już krótkotrwała inkubacja powodowała liniowy spadek aktywności metabolicznej komórek, a długotrwała ekspozycja na leki skutkowała postępującym spadkiem aktywności komórkowej i prawdopodobnie trwałym upośledzeniem funkcji mitochondriów. Wyniki te znajdują potwierdzenie w piśmiennictwie, gdzie stosunkowo nieliczne doniesienia wskazują na zależne od dawki leku przeciwdepresyjnego strukturalne i numeryczne nieprawidłowości w komórkach rozrodczych (spermatocytach) [23, 81] oraz znaczne, ale odwracalne zahamowanie procesu powstawania i dojrzewania gamet męskich [37, 82-84]. Ponadto, nasze obserwacje są zgodne z wcześniej prowadzonymi badaniami nad wpływem leków przeciwdepresyjnych w stężeniach mikromolarnych na linie komórkowe (inne niż linie komórkowe spermatocytów) oraz różne modele zwierzęce. Interesującym jest fakt, iż autorzy wskazują prawdopodobne różne mechanizmy toksyczności leków przeciwdepresyjnych względem poszczególnych typów komórek. Bartholomä i współpracownicy (2002) wykazali zmniejszenie żywotności komórek nerwowych hipokampa HT-22 oraz komórek guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy PC12. Obserwacjom towarzyszyła selektywna aktywacja kinazy białkowej regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK), biosynteza czynnika transkrypcyjnego Egr-1 oraz wzrost aktywności transkrypcyjnej czynnika NF- κ B [85]. Spadek żywotności komórek nerwowych oraz glejowych był związany z aktywacją autofagii oraz wzrostem syntezy LC3B-II i szlakiem zależnym od kinazy PI2 klasy III [86]. Wykazano również niejednorodny wpływ leków przeciwdepresyjnych na różnicowanie ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC) i efekt związany z powinowactwem do systemu transportera serotoniny [87]. Kolejne badania dostarczają dowodów na inicjację apoptozy związanej ze spadkiem aktywności metabolicznej komórek śródbłonkowych bariery krew-mózg [88],

nowotworowych płuc A549 i H460 [89], glejaka wielopostaciowego linii U-87 MG i GBM8401 [90, 91], glejaka C6 i Hs683 [92], komórek raka wątrobowo komórkowego HCC, SK-Hep1, Hep3B [93] oraz ludzkiego raka piersi MCF-7 [94]. Aktywacja apoptozy prawdopodobnie była związana ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia Ca^{2+} , nadprodukcją reaktywnych form tlenu, zatrzymaniem komórek w fazie sub-G1 cyku komórkowego oraz znaczną aktywnością kaspazy 3. Autorzy wykorzystując powyższe modele komórkowe wykazali toksyczny, zależny od dawki wpływ leków przeciwdepresyjnych. W dalszym jednak stopniu brakuje jednoznacznych dowodów eksperymentalnych wpływu leków na spermatogenezę, ponieważ wiele danych jest niejasnych, a mechanizmy pozostają niewyjaśnione. W związku z tym, w kolejnym etapie prowadzonych badań, podjęliśmy próbę wyjaśnienia przyczyny i określenie konkretnych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za spadki aktywności metabolicznej badanych komórek linii GC-1 spg oraz GC-2 spd poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych.

Uzyskane w trakcie prowadzonych badań wyniki wyraźnie sugerują, iż w każdym z kontrolowanych układów doświadczalnych doszło do wytworzenia stresu oksydacyjnego oraz nitrozacyjnego, który powstaje w momencie, kiedy ilość generowanych reaktywnych form tlenu (RFT) oraz reaktywnych form azotu (RFA) przekracza zdolność komórek do ich eliminacji oraz neutralizacji. Reaktywne formy tlenu i ogólnie wolne rodniki są niezbędne w sygnalizacji komórkowej i innych kluczowych funkcjach fizjologicznych, jednak nadmierne ich ilości mogą spowodować zmianę równowagi komórkowej redoks i zakłócić normalne funkcje biologiczne [95]. Uważa się, że tkanka jąder i plemniki są bardzo wrażliwe na zmiany poziomu wewnątrzkomórkowych RFT oraz peroksydację lipidów [96]. Dane piśmiennictwa wskazują, że stres oksydacyjny może być konsekwencją oddziaływania antydepresantów na komórki *in vitro* i przyczyną uszkodzenia wszystkich składników komórkowych. Niektóre z leków mogą dodatkowo prowadzić do uszkodzenia DNA nasienia poprzez zmianę równowagi redoks [97-99]. Wyjaśnieniem takich rezultatów jest zwiększona produkcja RFT/RFA i toksyczność z niej wynikająca, co powoduje zmniejszenie ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych i zaburzenia reakcji akrosomalnej, a następnie spadek ruchliwości i ilości plemników. Ponadto, wykazano że RFT oraz RFA inaktywują kilka kluczowych enzymów związanych z obroną antyoksydacyjną plemników (peroksydaza glutationowa,

dysmutaza ponadtlenkowa i dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa) oraz powodują dysfunkcję jąder, zmniejszone wydzielanie gonadotropin i nieprawidłowe parametry nasienia [95, 96, 100-102]. To właśnie zmiany hormonalne są uważane za ważne przyczyny zaburzeń rozrodczych [103]. Wiadomo, że ciągły stres oksydacyjny w tkance jąder powoduje również zmiany histopatologiczne. Stres oksydacyjny może wywołać zanik jąder i degenerację kanalików nasiennych poprzez zaburzenie integralności błony komórkowej [103].

Coraz więcej dowodów wskazuje, że niektóre leki przeciwdepresyjne mogą powodować nie tylko zaburzenia równowagi redoks, ale także zmiany w komórkowej zdolności antyoksydacyjnej. Z tego powodu kolejnym krokiem, po potwierdzeniu indukcji stresu oksydacyjnego u komórek wystawionych na działanie leków przeciwdepresyjnych była próba określenia mechanizmów komórkowych zaangażowanych w procesy anty-oksydacyjne. Zredukowany glutation to główny mechanizm antyoksydacyjny, stanowiący pierwszą linię obrony komórek i chroniący przed szkodliwym działaniem wolnych rodników [84, 104]. W ramach prowadzonych badań zaobserwowano wzrost poziomu glutationu w komórkach poddanych działaniu leków, niezależnie od czasu inkubacji oraz badanej linii komórkowej. Takie wyniki sugerują, że prawdopodobnie został uruchomiony komórkowy szlak enzymatycznej ochrony przed wolnymi rodnikami powstałymi na skutek stosowania leków. Tylko nieliczne prace dostarczają dowodów eksperymentalnych na zmiany poziomu glutationu w układach doświadczalnych z lekami przeciwdepresyjnymi. Niemniej, autorzy potwierdzają uzyskane przez nas wyniki, tj. ekspozycja na leki powoduje zwiększenie redukcji tioli oraz wzrost poziomu glutationu (zwierzęce modele eksperymentalne) [15, 105, 106].

Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu RFT i RFA może w konsekwencji prowadzić do istotnych zmian morfologicznych komórek. Z tego powodu w kolejnym etapie eksperymentów skontrolowano zmiany morfologiczne komórek linii GC-1 spg oraz GC-2 spd poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych w wybranych dawkach. Wraz ze wzrostem czasu inkubacji, komórki wykazywały liczne nieprawidłowości morfologiczne takie jak wakuolizacja cytoplazmy, powstawanie podwójnych jąder czy zahamowanie podziałów komórkowych. Co interesujące, wydaje się, że linia GC-2 spd jest bardziej odporna na działanie leków, ponieważ

dopiero długi czas ekspozycji spowodował widoczne zmiany morfologiczne. Dokonując przeglądu piśmiennictwa, nie odnaleziono publikacji naukowych mówiących o wpływie antydepresantów na zmiany morfologiczne komórek męskiego układu rozrodczego *in vitro*. Jedyne wyniki dotyczą nieprawidłowej morfologii plemników u pacjentów leczonych z powodu zaburzeń depresyjnych [83]. Pozostałe obserwacje w stosunku do parametrów nasienia odzwierciedlają wyniki badań na zwierzętach, które wskazują, że leki przeciwdepresyjne mogą mieć niekorzystny wpływ na spermatogenezę [45].

Wysoki poziom RFT i RFA może powodować kolejne zaburzenia w postaci niekorzystnych zmian w gospodarce energetycznej komórek. Stąd w następnym etapie badań monitorowano przemiany energetyczne komórek wystawionych na działanie leków przeciwdepresyjnych. Odnotowano sumaryczny spadek poziomu ATP zarówno po 48 jak i 96-godzinach inkubacji. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o postępującym upośledzeniu funkcji mitochondriów badanych komórek i tym samym dodatkowo potwierdzają wyniki uzyskane w trakcie przeprowadzonego testu oceny aktywności metabolicznej bezpośrednio związanego z funkcjonalnością mitochondriów. Kumar i wsp. (2006) sugeruje, że działanie plemnikobójcze jest spowodowane wpływem leków na syntezę trójfosforanu adenozy (ATP) przez hamowanie utleniającej fosforylacji w mitochondriach plemników i oddziaływanie z fosfolipidami w wewnętrznej błonie mitochondrialnej lub oddziaływanie z grupami sulfhydrylowymi obecnymi w błonie plemników. Z kolei, Charles i wsp. (2017) pokazuje również, że fluoksetyna obniża poziom mitochondrialnego ATP, niezbędnego dla wychwytu Ca^{2+} do retikulum endoplazmatycznego. Ponadto Ca^{2+} szybko gromadzi się w mitochondriach, co prowadzi do przeciążenia mitochondrialnego Ca^{2+} i śmierci komórek [83, 107, 108].

Mając na uwadze możliwość takich zdarzeń w przypadku niniejszych badań oraz dotychczas zdobyte informacje, dokonano oceny zmian profilu cyklu komórkowego na skutek działania leków przeciwdepresyjnych na komórki szlaku spermatogenezy. Analiza wykazała skrócenie fazy G0-G1, przy jednoczesnym wydłużeniu fazy S i G2/M dla linii komórek GC-1 spg. Ponownie, druga linia GC-2 spd nie wykazała większych zmian w profilu cyklu. Świadczyć to może o pozytywnym działaniu mechanizmów naprawczych oraz adaptacyjnych do

warunków stresowych. Analogiczne rezultaty uzyskały inne zespoły, wykazując zatrzymanie cyklu w fazie G2/M lub S, sugerując, że trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne mogą być cytotoksyczne i indukować apoptotyczną śmierć komórek prawdopodobnie przez szlak niezależny od mitochondriów [109, 110]. Przeciwnych obserwacji dokonał Mao z zespołem (2011), wykazując zatrzymanie komórek w fazie G0-G1 związane z hamowaniem aktywności cykliny D2 w liniach komórek szpiczaka przez amitryptylinę w sposób zależny od dawki. Białka cykliny typu D są krytycznymi czynnikami regulującymi przebieg cyklu komórkowego od fazy G1 do fazy S [111].

Istnieją wyniki sugerujące, że utrzymujący się wysoki poziom stresu oksydacyjnego może powodować uszkodzenia DNA komórek rozrodczych u pacjentów poddawanych leczeniu przeciwdepresyjnym. Dodatkowo, zatrzymanie cyklu komórkowego dającego czas na ewentualną naprawę może potwierdzać taką możliwość. Dlatego dalsze badania *in vitro* miały na celu zbadanie potencjalnego działania genotoksycznego leków przeciwdepresyjnych. Zaobserwowano znaczny wzrost powstawania mikrojąder we wszystkich układach doświadczalnych. Bez wątplenia może mieć to związek z dotychczasowymi wynikami, wskazującymi na utrzymujący się stres oksydacyjny/nitrozacyjny, upośledzenie enzymatycznych mechanizmów ochrony komórki oraz spadek potencjału mitochondrialnego w produkcji ATP i prawdopodobnie nieodwracalne uszkodzenie tych struktur komórkowych. Dane te są zgodne z poprzednimi obserwacjami, które ujawniły wzrost częstotliwości mikrojąder w przewlekłym i ostrym leczeniu przeciwdepresyjnym w sposób zależny od dawki. Autorzy sugerują, że przewlekłe podawanie leków przeciwdepresyjnych może wpływać na niektóre mechanizmy podziału komórek [24, 112]. Tego typu zmiany są zjawiskiem bardzo niekorzystnym, ponieważ wszelkie uszkodzenia materiału genetycznego komórek generatywnych mają podstawowe znaczenie dla procesów rozrodczych ze względu na ich możliwość transmisji do przyszłych pokoleń. Nieliczne doniesienia ewidentnie dostarczają dowodów genotoksycznego działania tego typu leków, które mogą indukować zaburzenia procesów mitozy i mejozy, a także powodować aberracje chromosomowe. Podobne efekty zaobserwowano w przypadku amitryptyliny, klomipraminy oraz fluoksetyny [19, 23, 113-115]. Na podstawie powyższych informacji, podjęliśmy próbę określenia czy leki przeciwdepresyjne negatywnie wpływają na poziom ekspresji genów

ogrywających kluczową rolę w podziale mejozy. Zaburzenia w przebiegu mejozy są punktem krytycznym w procesie tworzenia haploidalnych gamet. Ogromną rolę w tym procesie odgrywa struktura kompleksu synaptonemalnego, powstająca w profazie I [116, 117]. Pierwsze dwa geny *SCP1* i *SCP3* odpowiedzialne są za tworzenie wspomnianego kompleksu znajdującego się pomiędzy chromosomami homologicznymi. Z kolei jądrowe białko NuMA bierze udział w tworzeniu wrzeciona kariokinetycznego. W badanych układach eksperymentalnych zaobserwowano wzrost ekspresji wszystkich badanych genów. Co interesujące, obserwowany efekt utrzymywał się jedynie w przypadku linii komórkowej GC-1 spg. Wyniki drugiej badanej linii były na poziomie kontroli z pojedynczymi wyjątkami. Uzyskane wyniki są pierwszymi danymi tego typu w ocenie stosowania leków przeciwdepresyjnych. W dostępnym piśmiennictwie można napotkać prace dotyczące wpływu leków przeciwnowotworowych na proces formowania wrzeciona podziałowego. Wyniki badań sugerują zaburzenia w organizacji centrosomu oraz nieprawidłowy rozdział chromosomów do komórek potomnych po wpływie działania decetakselemu [118, 119]. Nie znaleziono natomiast prac, w których autorzy zaprezentowaliby rezultaty badań dotyczące zmian w ekspresji w/w genów. Zaburzenia funkcji wspomnianych genów mogą skutkować niepłodnością męską oraz obniżoną płodnością osobniczą.

Istotą prowadzonych badań było przedstawienie molekularnego patomechanizmu obserwowanych zmian na poziomie komórkowym. W tym celu dokonano oceny poziomu syntezy wielu białek zaangażowanych w ścieżki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oraz ochronę i adaptację komórek do stanu stresu wywołanego ekspozycją komórek spermatocytów na leki przeciwdepresyjne. Analizując poziom syntezy białka NF- κ B oraz FGF2 zaobserwowano ich wyraźny wzrost we wszystkich układach eksperymentalnych linii GC-1 spg oraz GC-2 spd. Uzyskane rezultaty świadczą, że NF- κ B jest ważnym mechanizmem regulacji RTF w komórce. Zasadniczą rolą czynnika transkrypcyjnego jest również wewnątrzkomórkowe przenoszenie sygnałów oraz udział w odpowiedzi na bodźce, takie jak stres powodowany przez wolne rodniki. Ponadto, NF- κ B odgrywa ważną funkcję w innych procesach, w tym w rozwoju, wzroście i przeżyciu komórek, proliferacji oraz bierze udział w wielu stanach patologicznych [120]. Obok NF- κ B, również czynnik wzrostu fibroblastów (FGF2) reguluje szerokie spektrum funkcji

biologicznych, w tym przeżycie, migrację, proliferację i różnicowanie komórek [121]. Co więcej, szlak sygnałowy NF- κ B może odgrywać ważną rolę regulacyjną w neurogenezie hipokampa zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych [122]. Ponadto, czynnik ten został niedawno opisany jako ważny podmiot w patofizjologii depresji, z rolami w neurogenezie, transmisji synaptycznej i plastyczności komórek nerwowych [123]. FGF2 również może wpływać na funkcje neuronalne na wiele sposobów, w tym modulację transmisji glutaminianu lub wpływ na neuroprotekcję i plastyczność synaptyczną [124].

Tylko nieliczne badania potwierdzają uzyskane przez nas rezultaty i wskazują na zwiększenie plastyczności neuronów poprzez aktywację oraz wzrost syntezy NF- κ B i FGF2 na skutek podawania leków przeciwdepresyjnych [123, 125]. Niemniej, niewiele wiadomo na temat roli NF- κ B w wyspecjalizowanym, regulowanym hormonalnie środowisku tkanki jąder ssaków. Jego ekspresja została skorelowana z regulacją ekspresji genów specyficznych dla przebiegu procesu spermatogenezy i rozwoju plemników oraz udowodniono jego obecność w komórkach Sertoliego, spermatocytach czy spermatydach [126, 127]. Zdecydowanie więcej informacji w ogólnodostępnym piśmiennictwie można odnaleźć na temat funkcji FGF2 w komórkach rozrodczych. Ostatnie badania wykazały, że sygnalizacja FGF ma kluczowe znaczenie dla szerokiego zakresu funkcji determinujących i regulujących proces spermatogenezy. Czynniki FGF biorą udział w regulacji rozwoju jąder i utrzymaniu funkcji komórek zarodkowych w warunkach normalnych i patogennych. Ponadto, jądrowe izoformy FGF-2 mogą uczestniczyć w wewnątrzkomórkowej funkcji FGF-2 na pierwszych etapach spermatogenezy, mitozy lub inicjacji mejozy. Autorzy podkreślają, że mechanizm funkcji FGF w jądrach nie jest zbyt jasny i wymaga dokładnego wyjaśnienia [128, 129].

Obserwowane wcześniej zatrzymanie cyklu komórkowego może być związane z aktywacją białek biorących udział w molekularnej regulacji cyklu komórkowego. Dlatego w kolejnym etapie dokonano analizy syntezy białek p16, p21, p27 oraz p53 w układach komórek linii GC-1 spg i GC-2 spd poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych. Warto podkreślić, iż aktywacja wszystkich białek utrzymywała się w 48 jak również 96 godzinie. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na próbę skutecznego naprawienia powstałych uszkodzeń DNA prowadzącą do wznowienia

prolifracji lub też uruchomienia innych mechanizmów ochronnych umożliwiających adaptację komórek do stresu wywołanego lekami przeciwdepresyjnymi. Wynika to z faktu, iż spermatogeneza jest jednym z najbardziej złożonych i długotrwałych procesów proliferacji oraz różnicowania komórek w organizmie. Proces rozpoczyna się w kanalikach nasiennych jąder i jest regulowany przez różne czynniki znajdujące się w otaczającym je środowisku [78, 130, 131]. Nieprawidłowa regulacja cyklu komórkowego w czasie tego procesu może prowadzić do zaburzonego rozwoju komórek plemnikotwórczych, apoptozy komórek zarodkowych oraz zmniejszonej płodności [132]. Wszystkie z analizowanych białek mają zasadnicze znaczenie w regulacji cyklu komórkowego poprzez inhibicję kinazy zależnej od cyklin (CDK) (p16), blokadę inicjacji replikacji DNA przez hamowanie kompleksu CDK (p21), regulację aktywności CDK na przejściu fazowym G1/S (p27) oraz utrzymywaniu ściśle kontrolowanego podziału komórek (p53) [114]. Dane piśmiennictwa dostarczają dowodów, że białka p21 i p27 odgrywają kluczową rolę w samoodnowieniu i różnicowaniu komórek macierzystych jąder (podtypu nieodróżnicowanych plemników) [133]. Anacker i współpracownicy (2011) donoszą, że leki przeciwdepresyjne regulują różnicowanie i proliferację komórek hipokampa poprzez mechanizmy fosforylacji receptora glukokortykoidowego (GR) oraz zależnej od GR zwiększonej ekspresji białek p27 i p57 [134]. Kolejne badania potwierdzają bezpośrednio zatrzymanie cyklu komórkowego jako efekt działania leków przeciwdepresyjnych na komórki *in vitro* inne niż należące do szlaku spermatogenezy [135, 136]. Prawdopodobną przyczyną takich rezultatów mogło być hamowanie fosforylacji kinazy ERK1/2, zależny od stężenia spadek ekspresji c-fos, c-jun, cykliny A, cykliny D1 i zwiększonej ekspresji genów ścieżki p21/p53, które spowodowały spowolnienie cyklu komórkowego w sposób zależny od czasu inkubacji i stężenia badanego leku [137]. Z kolei inne wyniki pokazują wyjątkową rolę białka p21 w kontroli neurogenezy i potwierdzają hipotezę, że wszystkie klasy leków przeciwdepresyjnych typu wychwyty zwrotnego stymulują neurogenezę hipokampa przez hamowanie ekspresji p21 [138], co stoi poniekąd w opozycji do wyników przedstawionych w niniejszej pracy. Podobnie, Chen i Chuang (1999) silnie sugerują, że indukowany litem (stosowany w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej) wzrost regulacji Bcl-2 oraz obniżenie p53 i Bax odgrywają znaczącą rolę w neuroprotekcji przeciwko cytotoxyczności [139].

Nieodwracalny blok cyklu komórkowego może być również spowodowany uszkodzeniami w odcinkach telomerowych na końcach chromosomów. Konsekwencje dysfunkcji telomerów obejmują niestabilność genomową, apoptozę lub starzenie komórkowe. Ponadto, wzrost ekspresji TRF1 związany jest ze skracaniem telomerów, natomiast nadekspresja TRF2 ma związek z licznymi uszkodzeniami DNA na końcach telomerów [140]. Kolejno, badania wskazują na związek pomiędzy poziomem białek TRF1 i TRF2, ekspresją p53 i kinazy MAPK, a indukcją apoptozy i przedwczesnego starzenia komórkowego [24]. Na tej podstawie, w kolejnym etapie określono poziom syntezy białek zaangażowanych w ochronę końców cząsteczki DNA - TRF1 i TRF2. Odnotowaliśmy sumaryczny wzrost syntezy TRF1 oraz TRF2 w komórkach obu linii poddanych działaniu leków przeciwdepresyjnych przez okres 48 godzin. Co bardzo interesujące, tylko w komórkach linii GC-2 spd poziom syntezy powyższych białek utrzymywał się znacznie powyżej kontroli po 96 godzinach ekspozycji we wszystkich układach eksperymentalnych.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono wyników z badań eksperymentalnych dotyczących wpływu leków przeciwdepresyjnych na poziom ekspresji genów lub syntezy białek związanych w zabezpieczeniu odcinków telomerowych w komórkach szlaku spermatogenezy. Nieliczne prace wskazują na skracanie długości telomerów w grupie pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi [141, 142] oraz zmiany w ilości mitochondrialnego DNA (mtDNA) i długości telomerów jako konsekwencje stresu i depresji [143]. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do zaproponowania nowego mechanizmu szlaku apoptozy komórek spermatocytów związanego z białkami TRF1 i TRF2.

Obok uszkodzeń w obrębie telomerowego DNA, również zaburzenia w przebiegu mejozy są punktem krytycznym powstawania gamet męskich. Celem kolejnego zadania było określenie czy wybrane leki przeciwdepresyjne powodują zmiany w poziomie ekspresji białek odpowiedzialnych za tworzenie wrzeciona kariokinetycznego (NuMa) oraz tworzenie struktury kompleksu synaptonemalnego (SCP1 i SCP3). Nasze wyniki wykazały sumaryczny wzrost aktywności wszystkich trzech białek pod wpływem leków przeciwdepresyjnych. Wyjątkiem była linia komórek GC-2 spd gdzie po 96h inkubacji obserwowano spadek syntezy białek. Co

więcej, nasze wcześniejsze rezultaty dotyczące analizy poziomu ekspresji mRNA znajdują odzwierciedlenie w poziomie syntezy białka docelowego dla analizowanych genów.

Ekspresja białek SCP1 oraz SCP3 jest charakterystyczna dla komórek spermatocytów podczas profazy pierwszego podziału mejotycznego. Nieprawidłowa ekspresja tych białek pod wpływem działania leków przeciwdepresyjnych może przyczynić się do niestabilności genomowej, której wynikiem są aberracje chromosomowe, czyli zaburzenia polegające na zmianie liczby lub struktury chromosomów [19, 23, 144-146]. Białko NuMA występuje natomiast głównie w jądrze komórkowym w czasie interfazy. Odgrywa kluczową rolę podczas organizacji i stabilizacji biegunów wrzeciona podziałowego. Białko to jest ściśle zależne od fazy cyklu komórkowego, a jego rozkład jest regulowany poprzez fosforylację i defosforylację [147]. W dostępnym piśmiennictwie można napotkać prace sugerujące zaburzenia formowania wrzeciona podziałowego po ekspozycji na różne składniki leków o szerokim zakresie aktywności farmakologicznej [148]. Ponadto, od ponad 20 lat znane są grupy leków cytotoksycznych, które wchodzi w interakcje z podjednostkami tubuliny prowadząc do zaburzenia procesów polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul, a przez to bezpośrednio upośledzając funkcję wrzeciona podziałowego. Wynika to z faktu, iż białko NuMa pozostaje w bezpośredniej interakcji z tubuliną podczas podziału komórkowego [149].

Ostatnia analizowana grupa białek jest ściśle związana z regulacją apoptozy. Uzyskane wyniki, wskazują na indukcję apoptotycznej śmierci komórkowej na skutek inkubacji komórek badanych linii z lekami przeciwdepresyjnymi w wybranych stężeniach. We wszystkich układach doświadczalnych, obserwowane zjawiska były związane ze wzrostem syntezy białka wykonawczego zaprogramowanej śmierci komórki - kaspazy 3. Aktywacja enzymów z grupy kaspaz jest ściśle kontrolowana. Kaspazy występują jako nieaktywne proenzymy, które podlegają obróbce proteolitycznej w celu wytworzenia dwóch podjednostek, które dimeryzują tworząc aktywny enzym, katalizujący specyficzne rozszczepienie wielu kluczowych białek komórkowych [150]. Równocześnie odnotowaliśmy spadek syntezy białka Bcl-2 (ponownie we wszystkich układach eksperymentalnych, niezależnie od czasu inkubacji, badanego leku czy linii komórkowej), regulującego apoptozę, ale również posiadającego szereg bardzo istotnych funkcji dla zachowania prawidłowego

funkcjonowania zdrowych komórek. Ponadto, rodzina białek Bcl-2 obejmuje inhibitory i aktywatory śmierci komórki, które razem mogą regulować i pośredniczyć w procesie, w którym mitochondria przyczyniają się do śmierci komórki znanej jako wewnętrzny szlak apoptozy [151]. Apoptoza jest niezbędnym procesem fizjologicznym, który odgrywa ważną rolę w różnych procesach fizjologicznych. Podobnie jak w przypadku kilku innych narządów, apoptoza zachodzi z dużą częstotliwością w męskim narządzie rozrodczym, jądrze. Aktywacja kaspazy, translokacja fosfatydyloseryny, zmiana potencjału błony mitochondrialnej i fragmentacja DNA są markerami apoptozy występującymi w plemnikach [80]. Apoptoza komórkowa wydaje się zachodzić w sposób ciągły w komórkach tkanki jąder, ponieważ spermatogeneza ssaków jest złożonym procesem, który wymaga precyzyjnej homeostazy różnych typów komórek [152]. Co ważniejsze, brak jest dokładnych, mechanistycznych danych dotyczących indukcji apoptozy w komórkach spermatocytów poprzez różne leki przeciwdepresyjne. Niemniej, uzyskane wyniki w ramach prowadzonych badań znajdują odzwierciedlenie w piśmiennictwie. Soliman i współpracownicy (2017) wykazali intensywną ekspresję kaspazy-3, zmniejszenie średniej liczby immunobarwienia jądrowego antygeny komórek proliferujących i negatywną ekspresję receptora androgenowego komórek tkanki jąder wystawionych na działanie leku przeciwdepresyjnego fluoksetyny [80]. Wyniki były analogiczne do badań innych autorów [153, 154]. Ponadto, antydepresanty powodują peroksydację lipidów prowadząc do uwalniania wolnych rodników, co powoduje dezorganizację błony komórkowej, a następnie znaczne uszkodzenie tkanki. Niedawno Atli i inni (2017) udowodnili, że SSRIs indukują fragmentację DNA i nadprodukcję reaktywnych form tlenu w wyniku stresu oksydacyjnego, który indukuje uszkodzenie komórek narządów płciowych samca szczura [155]. Również białko Bcl-2 reguluje proces apoptozy. Wzajemne oddziaływanie białek z tej rodziny decyduje o śmierci lub przeżyciu komórki. Zhang i inni (2014) zasugerowali, że pacjenci z zaburzeniami depresyjnymi charakteryzują się niską ekspresją mRNA anty-apoptotycznego białka Bcl-2. Co interesujące, autorzy obserwowali wzrost poziomu Bcl-2 na skutek terapii lekami przeciwdepresyjnymi i wskazują, że właśnie Bcl-2 może odgrywać ważną rolę w pośredniczeniu leczenia [156]. Przedkliniczne badania wykazały, że leczenie fluoksetyną indukuje podwyższony poziom Bcl-2 i chroni przed apoptotyczną śmiercią komórek poprzez interakcję z mitochondrialnym, zależnym od napięcia, kanałem anionowym [157, 158].

Dotychczasowe badania cytotoksyczności leków w stosunku do komórek spermatocytów wykazały wyraźne zaburzenia strukturalne i liczbowe chromosomów, zmniejszenie indeksu mitotycznego oraz liczby podziałów mejotycznych. Również leki przeciwdepresyjne powodowały zwiększenie częstotliwości występowania komórek plemnikowych z zaburzeniami główki oraz wici [19, 23]. Stąd, efekty cytotoksyczne mogą być związane z uszkodzeniami komórek na poziomie materiału genetycznego. W naszych badaniach markerami genotoksycznego działania leków przeciwdepresyjnych na komórki GC-1 spg oraz GC-2 spd była fragmentacja komórkowego DNA techniką TUNEL oraz jednoznaczne potwierdzenie śmierci komórek badanych linii za pomocą dwóch metod barwienia różnicowego. We wszystkich układach obserwowaliśmy wzrost komórek TUNEL pozytywnych, świadczących o apoptozie badanych komórek. Jednocześnie odnotowaliśmy sumaryczny wzrost ilości martwych komórek we wszystkich badanych układach. Dodatkowo ilość komórek martwych oraz TUNEL+ wzrastała wraz z czasem trwania hodowli. Uzyskane rezultaty były spójne z poprzednimi obserwacjami innych autorów, którzy dostarczają dowodów genotoksycznego działania tego typu leków, które mogą indukować zaburzenia procesów mitozy i mejozy, a także powodować aberracje chromosomowe. Takie efekty zaobserwowano w przypadku amitryptyliny, klomipraminy oraz fluoksetyny [19, 23, 24, 113, 114]. Strandgaard i Miller (1998) odnotowali istotne nasilenie apoptozy komórek spermatocytów szczura już po 24 i 48h ekspozycji [159]. Camara i współpracownicy (2019) sugerują jednak, że to uszkodzenia w komórkach Leydiga wystawionych na działanie leków przeciwdepresyjnych, powodują nieprawidłowości w całym procesie spermatogenezy [160]. Powszechnie stosowane leki przeciwdepresyjne, takie jak amitryptylina i fluoksetyna mogą również indukować autofagię w komórkach poprzez powolne gromadzenie sfingomieliny w lizosomach i błonach aparatu Golgiego oraz ceramidu w retikulum endoplazmatycznym (ER). Ceramid ER stymuluje fosfatazę 2A, a tym samym białka związane bezpośrednio z autofagią jak ULK, beclinę 1, p62 i LC3B [161]. Długotrwałe stosowanie leków może prowadzić do uszkodzenia błony komórkowej oraz integralności komórkowego DNA powodując redukcję liczby plemników, zaburzenia ruchliwości oraz anomalie dotyczące wyglądu morfologicznego.

Podsumowując, leki przeciwdepresyjne mają opóźniony początek działania terapeutycznego, co wiąże się z koniecznością ich długotrwałego stosowania. Przyjmowanie tego typu leków może powodować efekty niepożądane. Nieliczne doniesienia wskazują również, iż może to skutkować odległymi w czasie zaburzeniami różnych funkcji życiowych, w tym funkcji i procesów rozrodczych. W ramach niniejszej pracy dostarczamy molekularnych dowodów dotyczących prawdopodobnie nieodwracalnych zaburzeń w przebiegu spermatogenezy poprzez uszkodzenie komórek plemnikotwórczych.

Uzyskane wyniki stanowią niewątpliwie istotny element poznawczy dotyczący niepożądanych skutków działania leków przeciwdepresyjnych na komórki męskiego układu rozrodczego w systemie *in vitro*, jak również wskazują na możliwość bezpośredniego oddziaływania substancji chemicznej lub jej metabolitu z materiałem genetycznym gonad i komórek rozrodczych umożliwiając zaproponowanie konkretnego mechanizmu odpowiedzialnego za obniżenie męskiej płodności osobniczej.

6. Wnioski

- Wykazano cytotoksyczne właściwości leków przeciwdepresyjnych związane ze spadkiem aktywności metabolicznej oraz nieprawidłowościami morfologicznymi bezpośrednio zależnymi od stężenia substancji oraz czasu ekspozycji.
- Wykazano zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej poprzez zjawisko stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w wyniku zwiększonej ilości reaktywnych form tlenu i azotu.
- Wykazano udział mechanizmów enzymatycznej oraz nieenzymatycznej ochrony komórek przed działaniem wolnych rodników w odniesieniu do komórek męskiego układu rozrodczego.
- Wykazano, że następstwem utrzymującego się stresu oksydacyjnego jest upośledzenie funkcji mitochondriów, spadek produkcji ATP oraz zatrzymanie cyklu komórkowego linii GC-1 spg oraz GC-2 spd. Obserwowane efekty związane są z aktywacją białek p21 i p53 oraz ścieżki zależnej od p16 w odpowiedzi na powstałe uszkodzenia DNA.
- Wykazano inicjację mechanizmu zaprogramowanej śmierci komórkowej związanego z:
 - potencjalnie genotoksycznymi właściwościami leków przeciwdepresyjnych charakteryzującymi się wzrostem uszkodzeń kwasów nukleinowych i nadprodukcją mikrojąder.
 - uruchomieniem mechanizmów adaptacyjnych zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA, zabezpieczających telomerowe odcinki chromosomów oraz stabilizujących wrzeciono kariokinetyczne.
- Wykorzystane techniki umożliwiają częściowe zrozumienie patomechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych i związanej z nimi reprotoksyczności względem komórek męskiego układu rozrodczego. Ponadto, uzyskane wyniki umożliwiają wskazanie nowego mechanizmu prawdopodobnie odpowiedzialnego za obniżenie męskiej płodności na skutek farmakotoksycznego działania leków o różnym profilu działań niepożądanych.

7. Piśmiennictwo

1. Bentley, S.M., G.L. Pagalilauan, and S.A. Simpson, *Major depression*. Med Clin North Am, 2014. **98**(5): p. 981-1005.
2. Schuch, F.B., et al., *Exercise as a treatment for depression: A meta-analysis adjusting for publication bias*. J Psychiatr Res, 2016. **77**: p. 42-51.
3. Wittchen, H.U., et al., *The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010*. Eur Neuropsychopharmacol, 2011. **21**(9): p. 655-79.
4. Balon, R., *Depression, antidepressants, and human sexuality*. Primary Psychiatry, 2007. **14**(2): p. 42-44,47-50.
5. La Torre, A., et al., *Sexual dysfunction related to psychotropic drugs: a critical review--part I: antidepressants*. Pharmacopsychiatry, 2013. **46**(5): p. 191-9.
6. Bijlsma, E.Y., et al., *Sexual side effects of serotonergic antidepressants: mediated by inhibition of serotonin on central dopamine release?* Pharmacol Biochem Behav, 2014. **121**: p. 88-101.
7. Richards, D., *Prevalence and clinical course of depression: a review*. Clin Psychol Rev, 2011. **31**(7): p. 1117-25.
8. Segraves, R.T. and R. Balon, *Antidepressant-induced sexual dysfunction in men*. Pharmacol Biochem Behav, 2014. **121**: p. 132-7.
9. Siwek, M., et al., *Zinc as a marker of affective disorders*. Pharmacol Rep, 2013. **65**(6): p. 1512-8.
10. Bramer, G.R., *International statistical classification of diseases and related health problems. Tenth revision*. World Health Stat Q, 1988. **41**(1): p. 32-6.
11. Bryant, R.A., *Prolonged grief: where to after Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition?* Curr Opin Psychiatry, 2014. **27**(1): p. 21-6.
12. Arean, P.A. and G. Niu, *Choosing treatment for depression in older adults and evaluating response*. Clin Geriatr Med, 2014. **30**(3): p. 535-51.
13. Belmaker, R.H. and G. Agam, *Major depressive disorder*. N Engl J Med, 2008. **358**(1): p. 55-68.
14. Collins, P.Y., et al., *Grand challenges in global mental health*. Nature, 2011. **475**(7354): p. 27-30.

15. Elnazer, H.Y. and D.S. Baldwin, *Treatment with citalopram, but not with agomelatine, adversely affects sperm parameters: a case report and translational review*. *Acta Neuropsychiatr*, 2014. **26**(2): p. 125-9.
16. Jennings, L., *Antidepressants*. In: Grossberg G., Kinsella L. (eds) *Clinical Psychopharmacology for Neurologists*. Springer, Cham, 2018: p. 45-71.
17. O'Connor, E.A., et al., *Screening for Depression in Adults and Older Adults in Primary Care*. 2009.
18. Mulrow, C.D., et al., *Treatment of depression--newer pharmacotherapies*. *Psychopharmacol Bull*, 1998. **34**(4): p. 409-795.
19. Alzahrani, H.A., *Sister chromatid exchanges and sperm abnormalities produced by antidepressant drug fluoxetine in mouse treated in vivo*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012. **16**(15): p. 2154-61.
20. Blier, P., *Optimal use of antidepressants: when to act?* *J Psychiatry Neurosci*, 2009. **34**(1): p. 80.
21. Sanacora, G., G. Treccani, and M. Popoli, *Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders*. *Neuropharmacology*, 2012. **62**(1): p. 63-77.
22. Edwards, I.R. and J.K. Aronson, *Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management*. *Lancet*, 2000. **356**(9237): p. 1255-9.
23. Hassanane, M.S., et al., *Genotoxic evaluation for the tricyclic antidepressant drug, amitriptyline*. *Drug Chem Toxicol*, 2012. **35**(4): p. 450-5.
24. Morelli, M.A., et al., *Analysis of meiotic prophase I in live mouse spermatocytes*. *Chromosome Res*, 2008. **16**(5): p. 743-60.
25. Rizvi, S.J. and S.H. Kennedy, *Psychopharmacology for the Clinician*. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 2013. **38**(5): p. 27-28.
26. Montejo, A.L., L. Montejo, and F. Navarro-Cremades, *Sexual side-effects of antidepressant and antipsychotic drugs*. *Curr Opin Psychiatry*, 2015. **28**(6): p. 418-23.
27. Khazaie, H., et al., *Antidepressant-induced sexual dysfunction during treatment with fluoxetine, sertraline and trazodone; a randomized controlled trial*. *Gen Hosp Psychiatry*, 2015. **37**(1): p. 40-5.
28. Baldwin, D.S. and T. Foong, *Antidepressant drugs and sexual dysfunction*. *Br J Psychiatry*, 2013. **202**: p. 396-7.

29. Park, Y.M., *Relationship between SSRI-induced sexual dysfunction and central serotonergic activity based on the loudness dependence of auditory evoked potentials*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2014. **231**(3): p. 551-5.
30. Higgins, A., M. Nash, and A.M. Lynch, *Antidepressant-associated sexual dysfunction: impact, effects, and treatment*. *Drug Healthc Patient Saf*, 2010. **2**: p. 141-50.
31. Taylor, M.J., et al., *Strategies for managing sexual dysfunction induced by antidepressant medication*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(5): p. CD003382.
32. Clayton, A.H., et al., *Sexual dysfunction associated with major depressive disorder and antidepressant treatment*. *Expert Opin Drug Saf*, 2014. **13**(10): p. 1361-74.
33. Keks, N.A., J. Hope, and C. Culhane, *Management of antidepressant-induced sexual dysfunction*. *Australas Psychiatry*, 2014. **22**(6): p. 525-8.
34. Stukenborg, J.B., et al., *New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells*. *Mol Hum Reprod*, 2009. **15**(9): p. 521-9.
35. Koyuncu, H., et al., *Deleterious effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on semen parameters in patients with lifelong premature ejaculation*. *Int J Impot Res*, 2012. **24**(5): p. 171-3.
36. Ding, J., et al., *FDA-approved medications that impair human spermatogenesis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(6): p. 10714-10725.
37. Riggin, L. and G. Koren, *Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on sperm and male fertility*. *Canadian Family Physician*, 2015. **61**(6): p. 529-530.
38. Cascade, E., A.H. Kalali, and T.A. Smitherman, *Treatment of migraine and the role of psychiatric medications*. *Psychiatry (Edgmont)*, 2008. **5**(10): p. 20-2.
39. Ferguson, J.M., *SSRI Antidepressant Medications: Adverse Effects and Tolerability*. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*, 2001. **3**(1): p. 22-27.
40. Aizenberg, D., et al., *Painful ejaculation associated with antidepressants in four patients*. *J Clin Psychiatry*, 1991. **52**(11): p. 461-3.
41. Karp, J.F., et al., *Imipramine and sexual dysfunction during the long-term treatment of recurrent depression*. *Neuropsychopharmacology*, 1994. **11**(1): p. 21-7.

42. Chen, L.W., et al., *Amitriptyline and Sexual Function: A Systematic Review Updated for Sexual Health Practice*. Am J Mens Health, 2018. **12**(2): p. 370-379.
43. Stearns, G. and P.J. Turek, *Avoiding toxins including spermatotoxic medications*. Semin Reprod Med, 2013. **31**(4): p. 286-92.
44. Levin, R.M., et al., *Effects of psychotropic drugs on human sperm motility*. Fertil Steril, 1981. **36**(4): p. 503-6.
45. Hall, E. and V.K. Burt, *Male fertility: psychiatric considerations*. Fertil Steril, 2012. **97**(2): p. 434-9.
46. Thase, M.E., *The role of monoamine oxidase inhibitors in depression treatment guidelines*. J Clin Psychiatry, 2012. **73 Suppl 1**: p. 10-6.
47. Fiedorowicz, J.G. and K.L. Swartz, *The role of monoamine oxidase inhibitors in current psychiatric practice*. J Psychiatr Pract, 2004. **10**(4): p. 239-48.
48. Gupta, H., K.K. Maheshwari, and N. Kumar, *Reversible germ cell toxicity of sulphasalazine and ampicillin combination in male rats*. J Reprod Infertil, 2013. **14**(3): p. 126-32.
49. Fooladi, E., et al., *Testosterone improves antidepressant-emergent loss of libido in women: findings from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. J Sex Med, 2014. **11**(3): p. 831-9.
50. Kennedy, S.H. and S. Rizvi, *Sexual dysfunction, depression, and the impact of antidepressants*. J Clin Psychopharmacol, 2009. **29**(2): p. 157-64.
51. Marazziti, D., et al., *Dimorphic changes of some features of loving relationships during long-term use of antidepressants in depressed outpatients*. J Affect Disord, 2014. **166**: p. 151-5.
52. Masiran, R., et al., *Female sexual dysfunction in patients with major depressive disorder (MDD) treated with selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) and its association with serotonin 2A-1438 G/A single nucleotide polymorphisms*. J Sex Med, 2014. **11**(4): p. 1047-1055.
53. Crawford, A.A., et al., *Adverse effects from antidepressant treatment: randomised controlled trial of 601 depressed individuals*. Psychopharmacology (Berl), 2014. **231**(15): p. 2921-31.
54. Safarinejad, M.R., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy and safety of bupropion for treating hypoactive sexual desire disorder in ovulating women*. BJU Int, 2010. **106**(6): p. 832-9.

55. Michael, A. and J.J. Herrod, *Citalopram-induced decreased libido*. Br J Psychiatry, 1997. **171**: p. 90.
56. Clayton, A.H., et al., *Bupropion extended release compared with escitalopram: effects on sexual functioning and antidepressant efficacy in 2 randomized, double-blind, placebo-controlled studies*. J Clin Psychiatry, 2006. **67**(5): p. 736-46.
57. Jacobsen, P.L., et al., *Effect of Vortioxetine vs. Escitalopram on Sexual Functioning in Adults with Well-Treated Major Depressive Disorder Experiencing SSRI-Induced Sexual Dysfunction*. J Sex Med, 2015. **12**(10): p. 2036-48.
58. Dorevitch, A. and H. Davis, *Fluvoxamine-associated sexual dysfunction*. Ann Pharmacother, 1994. **28**(7-8): p. 872-4.
59. Kurose, K., et al., *Genome-wide association study of SSRI/SNRI-induced sexual dysfunction in a Japanese cohort with major depression*. Psychiatry Res, 2012. **198**(3): p. 424-9.
60. Clayton, A.H., et al., *Symptoms of sexual dysfunction in patients treated for major depressive disorder: a meta-analysis comparing selegiline transdermal system and placebo using a patient-rated scale*. J Clin Psychiatry, 2007. **68**(12): p. 1860-6.
61. Westenberg, H.G. and C. Sandner, *Tolerability and safety of fluvoxamine and other antidepressants*. Int J Clin Pract, 2006. **60**(4): p. 482-91.
62. Waldinger, M.D., et al., *Effect of SSRI antidepressants on ejaculation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study with fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine, and sertraline*. J Clin Psychopharmacol, 1998. **18**(4): p. 274-81.
63. Lahon, K., et al., *Sexual dysfunction with the use of antidepressants in a tertiary care mental health setting - a retrospective case series*. J Pharmacol Pharmacother, 2011. **2**(2): p. 128-31.
64. Korobkova, E.A., et al., *In vitro studies of DNA damage caused by tricyclic antidepressants: a role of peroxidase in the side effects of the drugs*. Chem Res Toxicol, 2010. **23**(9): p. 1497-503.
65. Sansone, R.A. and L.A. Sansone, *Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors: a pharmacological comparison*. Innov Clin Neurosci, 2014. **11**(3-4): p. 37-42.

66. Montgomery, S.A., *Tolerability of serotonin norepinephrine reuptake inhibitor antidepressants*. CNS Spectr, 2008. **13**(7 Suppl 11): p. 27-33.
67. Lee, K.U., et al., *Antidepressant-Induced Sexual Dysfunction among Newer Antidepressants in a Naturalistic Setting*. Psychiatry Investig, 2010. **7**(1): p. 55-9.
68. Taylor, C., et al., *Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways*. Cell Signal, 2005. **17**(5): p. 549-57.
69. Padmanabhan, S., et al., *Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid*. Mutat Res, 2009. **673**(1): p. 43-52.
70. Mhaouty-Kodja, S., et al., *Fertility and spermatogenesis are altered in α 1b-adrenergic receptor knockout male mice*. J Endocrinol, 2007. **195**(2): p. 281-92.
71. Collin, O., J.E. Damber, and A. Bergh, *5-Hydroxytryptamine--a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats*. J Reprod Fertil, 1996. **106**(1): p. 17-22.
72. Jimenez-Trejo, F., et al., *Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies*. J Androl, 2007. **28**(1): p. 136-49.
73. Syed, V., E. Gomez, and N.B. Hecht, *Messenger ribonucleic acids encoding a serotonin receptor and a novel gene are induced in Sertoli cells by a secreted factor(s) from male rat meiotic germ cells*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5754-60.
74. Fujinoki, M., *Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm*. Reproduction, 2011. **142**(2): p. 255-66.
75. Gonzales, G.F., M. Garcia-Hjarles, and G. Velasquez, *Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: their relationship to seminal quality*. Andrologia, 1992. **24**(2): p. 95-100.
76. Parisi, E., et al., *Serotonin and sperm motility*. Cell Biol Int Rep, 1984. **8**(2): p. 95.

77. Warner-Schmidt, J.L., et al., *Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9262-7.
78. Sato, T., et al., *In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 504-7.
79. Monteiro Filho, W.O., et al., *Fluoxetine induces changes in the testicle and testosterone in adult male rats exposed via placenta and lactation*. Syst Biol Reprod Med, 2014. **60**(5): p. 274-81.
80. Soliman, M.E., et al., *Effect of antidepressant drug (fluoxetine) on the testes of adult male albino rats and the possible protective role of omega-3*. Menoufia Med J, 2017. **30**: p. 1135-42.
81. El-Fikya, S.A., et al., *Genotoxic effect of the tricyclic antidepressant drug clomipramine hydrochloride in somatic and germ cells of male mice*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2016. **6**(4): p. 321-327.
82. Maier, U. and G. Koinig, *Andrological findings in young patients under long-term antidepressive therapy with clomipramine*. Psychopharmacology (Berl), 1994. **116**(3): p. 357-9.
83. Kumar, V.S., et al., *The spermicidal and antitrichomonas activities of SSRI antidepressants*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. **16**(9): p. 2509-12.
84. Abdel-Salam, O.M.E., S.M.Y. Morsy, and A.A. Sleem, *The effect of different antidepressant drugs on oxidative stress after lipopolysaccharide administration in mice*. EXCLI J, 2011. **10**: p. 290-302.
85. Bartholoma, P., et al., *Neuronal cell death induced by antidepressants: lack of correlation with Egr-1, NF-kappa B and extracellular signal-regulated protein kinase activation*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(8): p. 1507-16.
86. Zschocke, J., et al., *Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons--dissociation from cholesterol homeostasis*. Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(8): p. 1754-68.
87. Kruk, J.S., et al., *The Effect of Antidepressants on Mesenchymal Stem Cell Differentiation*. J Bone Metab, 2018. **25**(1): p. 43-51.
88. Elmorsy, E., et al., *Antidepressants are cytotoxic to rat primary blood brain barrier endothelial cells at high therapeutic concentrations*. Toxicol In Vitro, 2017. **44**: p. 154-163.

89. Yuan, I., et al., *Escitalopram oxalate inhibits proliferation and migration and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(3): p. 3376-3382.
90. Karpel-Massler, G., et al., *Olanzapine inhibits proliferation, migration and anchorage-independent growth in human glioblastoma cell lines and enhances temozolomide's antiproliferative effect*. *J Neurooncol*, 2015. **122**(1): p. 21-33.
91. Chen, V.C., et al., *Escitalopram oxalate induces apoptosis in U-87MG cells and autophagy in GBM8401 cells*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(2): p. 1167-1178.
92. Liu, K.H., et al., *Fluoxetine, an antidepressant, suppresses glioblastoma by evoking AMPAR-mediated calcium-dependent apoptosis*. *Oncotarget*, 2015. **6**(7): p. 5088-101.
93. Chen, W.T., et al., *Fluoxetine Induces Apoptosis through Extrinsic/Intrinsic Pathways and Inhibits ERK/NF-kappaB-Modulated Anti-Apoptotic and Invasive Potential in Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(3).
94. Cho, Y.W., et al., *Paroxetine Induces Apoptosis of Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Ca(2+)-and p38 MAP Kinase-Dependent ROS Generation*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(1).
95. Doshi, S.B., et al., *Role of reactive nitrogen species in male infertility*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012. **10**: p. 109.
96. Aprioku, J.S., *Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis*. *J Reprod Infertil*, 2013. **14**(4): p. 158-72.
97. Viola, G., et al., *In vitro studies of the phototoxic potential of the antidepressant drugs amitriptyline and imipramine*. *Farmacol*, 2000. **55**(3): p. 211-8.
98. Xia, Z., et al., *Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L)*. *Biochem Pharmacol*, 1999. **57**(10): p. 1199-208.
99. Griveau, J.F., et al., *Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa*. *J Reprod Fertil*, 1995. **103**(1): p. 17-26.

100. Ilgin, S., et al., *Toxic Effects of Trazodone on Male Reproductive System via Disrupting Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis and Inducing Testicular Oxidative Stress*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 7196142.
101. Erdemir, F., et al., *The effect of sertraline, paroxetine, fluoxetine and escitalopram on testicular tissue and oxidative stress parameters in rats*. *Int Braz J Urol*, 2014. **40**(1): p. 100-8.
102. Bandegi, L., et al., *Effects of antidepressants on parameters, melondiadehyde, and diphenyl-2-picryl-hydrazyl levels in mice spermatozoa*. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 2018. **16**(6): p. 365-372.
103. Fernandez-Checa, J.C., et al., *Mitochondrial glutathione: importance and transport*. *Semin Liver Dis*, 1998. **18**(4): p. 389-401.
104. Paolicchi, A., et al., *Glutathione catabolism as a signaling mechanism*. *Biochem Pharmacol*, 2002. **64**(5-6): p. 1027-35.
105. Duda, W., et al., *The Effect of Chronic Mild Stress and Imipramine on the Markers of Oxidative Stress and Antioxidant System in Rat Liver*. *Neurotox Res*, 2016. **30**(2): p. 173-84.
106. Pal, S.N. and P.C. Dandiya, *Glutathione as a cerebral substrate in depressive behavior*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1994. **48**(4): p. 845-51.
107. Charles, E., et al., *The antidepressant fluoxetine induces necrosis by energy depletion and mitochondrial calcium overload*. *Oncotarget*, 2017. **8**(2): p. 3181-3196.
108. Arimochi, H. and K. Morita, *Characterization of cytotoxic actions of tricyclic antidepressants on human HT29 colon carcinoma cells*. *Eur J Pharmacol*, 2006. **541**(1-2): p. 17-23.
109. Biber, A., I.Z. Durusu, and C. Ozen, *In vitro anticancer effect of tricyclic antidepressant nortriptyline on multiple myeloma*. *Turk J Biol*, 2018. **42**(5): p. 414-421.
110. Mao, X., et al., *The tricyclic antidepressant amitriptyline inhibits D-cyclin transactivation and induces myeloma cell apoptosis by inhibiting histone deacetylases: in vitro and in silico evidence*. *Mol Pharmacol*, 2011. **79**(4): p. 672-80.
111. Battal, D., et al., *In vivo genotoxicity assessment of sertraline by using alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus assay*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013. **113**(5): p. 339-46.

112. Avuloglu Yilmaz, E., F. Unal, and D. Yuzbasioglu, *Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antidepressant drug-active ingredients, trazodone and milnacipran, in vitro*. Drug Chem Toxicol, 2017. **40**(1): p. 57-66.
113. Speit, G., M. Vasquez, and A. Hartmann, *The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity*. Mutat Res, 2009. **681**(1): p. 3-12.
114. Roshdy, H.M. and A.A. Fyiad, *Cytogenetic and biochemical effects of antidepressant drug on male mice*. New York Science Journal, 2010.
115. Bisig, C.G., et al., *Synaptonemal complex components persist at centromeres and are required for homologous centromere pairing in mouse spermatocytes*. PLoS Genet, 2012. **8**(6): p. e1002701.
116. de Barros, F.O., M.I. Giassetti, and J.A. Jose Antonio Visintin, *Spermatogonial Stem Cells and Animal Transgenesis*. Innovations in Biotechnology, 2012.
117. Paoletti, A., et al., *Pulse treatment of interphasic HeLa cells with nanomolar doses of docetaxel affects centrosome organization and leads to catastrophic exit of mitosis*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 19)**: p. 2403-15.
118. Delfino, F. and W.H. Walker, *Stage-specific nuclear expression of NF-kappaB in mammalian testis*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(11): p. 1696-707.
119. Sakaushi, S., et al., *Live imaging of spindle pole disorganization in docetaxel-treated multicolor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **357**(3): p. 655-60.
120. Yun, Y.R., et al., *Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration*. J Tissue Eng, 2010. **2010**: p. 218142.
121. Caviedes, A., et al., *BDNF/NF-kappaB Signaling in the Neurobiology of Depression*. Curr Pharm Des, 2017. **23**(21): p. 3154-3163.
122. Elsayed, M., et al., *Antidepressant effects of fibroblast growth factor-2 in behavioral and cellular models of depression*. Biol Psychiatry, 2012. **72**(4): p. 258-65.
123. Bortolotto, V., et al., *NF-kappaB mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis: relevance to mood disorders and antidepressant activity*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 612798.
124. Jiang, X., et al., *The roles of fibroblast growth factors in the testicular development and tumor*. J Diabetes Res, 2013. **2013**: p. 489095.

125. Li, J., M.J. Poi, and M.D. Tsai, *Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer*. *Biochemistry*, 2011. **50**(25): p. 5566-82.
126. Lilienbaum, A., et al., *NF-kappa B is developmentally regulated during spermatogenesis in mice*. *Dev Dyn*, 2000. **219**(3): p. 333-40.
127. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. *Cell Res*, 2011. **21**(1): p. 103-15.
128. Gonzalez-Herrera, I.G., et al., *Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism*. *FASEB J*, 2006. **20**(3): p. 476-8.
129. Mallei, A., B. Shi, and I. Mocchetti, *Antidepressant treatments induce the expression of basic fibroblast growth factor in cortical and hippocampal neurons*. *Mol Pharmacol*, 2002. **61**(5): p. 1017-24.
130. Spiller, C., D. Wilhelm, and P. Koopman, *Cell cycle analysis of fetal germ cells during sex differentiation in mice*. *Biol Cell*, 2009. **101**(10): p. 587-98.
131. Sato, Y., M. Taniguchi, and T. Otoi, *Studying Spermatogenesis by using In vivo and In vitro Models: Advantages and Disadvantages of these Models for Practical use*. *J Veterinar Sci Technol*, 2012. **3**(115).
132. Kanatsu-Shinohara, M., S. Takashima, and T. Shinohara, *Transmission distortion by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(14): p. 6210-5.
133. Stopper, H., et al., *Antidepressant fluoxetine and its potential against colon tumors*. *World J Gastrointest Oncol*, 2014. **6**(1): p. 11-21.
134. Krishnan, A., et al., *Fluoxetine mediates G0/G1 arrest by inducing functional inhibition of cyclin dependent kinase subunit (CKS)1*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **75**(10): p. 1924-34.
135. Stepulak, A., et al., *Fluoxetine inhibits the extracellular signal regulated kinase pathway and suppresses growth of cancer cells*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(10): p. 1685-93.
136. Pechnick, R.N., et al., *Antidepressants stimulate hippocampal neurogenesis by inhibiting p21 expression in the subgranular zone of the hippocampus*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27290.

137. Chen, R.W. and D.M. Chuang, *Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity.* J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6039-42.
138. Anacker, C., et al., *Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor.* Mol Psychiatry, 2011. **16**(7): p. 738-50.
139. Vakonaki, E., et al., *Common mental disorders and association with telomere length.* Biomed Rep, 2018. **8**(2): p. 111-116.
140. Cai, N., et al., *Molecular signatures of major depression.* Curr Biol, 2015. **25**(9): p. 1146-56.
141. Ridout, K.K., et al., *Depression and telomere length: A meta-analysis.* J Affect Disord, 2016. **191**: p. 237-47.
142. Spallarossa, P., et al., *p38 MAPK and JNK antagonistically control senescence and cytoplasmic p16INK4A expression in doxorubicin-treated endothelial progenitor cells.* PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15583.
143. Powell, T.R., et al., *Telomere Length and Bipolar Disorder.* Neuropsychopharmacology, 2018. **43**(2): p. 454.
144. Draz, E.I., et al., *Genotoxicity of some commonly used antidepressants (Fluoxetine, Sertraline and Clomipramine).* Clinical Toxicology, 2009. **17**(2).
145. Lanni, C., M. Racchi, and S. Govoni, *Do we need pharmacogenetics to personalize antidepressant therapy?* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(18): p. 3327-40.
146. Endo, A., et al., *Nuclear mitotic apparatus protein, NuMA, modulates p53-mediated transcription in cancer cells.* Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e713.
147. Bhattacharya, S., et al., *NMK-TD-100, a novel microtubule modulating agent, blocks mitosis and induces apoptosis in HeLa cells by binding to tubulin.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76286.
148. Wysocki, P., *Epotilony – nowa klasa inhibitorów wrzeciona kariokinetycznego w leczeniu raka piersi.* Współczesna Onkologia, 2008. **12**(8): p. 343–348.
149. Porter, A.G. and R.U. Janicke, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis.* Cell Death Differ, 1999. **6**(2): p. 99-104.
150. Hardwick, J.M. and L. Soane, *Multiple functions of BCL-2 family proteins.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).

151. Shaha, C., R. Tripathi, and D.P. Mishra, *Male germ cell apoptosis: regulation and biology*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1546): p. 1501-15.
152. Shukla, K.K., A.A. Mahdi, and S. Rajender, *Apoptosis, spermatogenesis and male infertility*. Front Biosci (Elite Ed), 2012. **4**: p. 746-54.
153. Saber, A.S., A.M. Hoda, and M. M.E., *Ameliorative effect of curcumin on fluoxetine-induced reproductive toxicity and oxidative stress in male albino rats*. Oxid Antioxid Med Sci, 2013. **2**(1): p. 29-35.
154. Khaksar, M., et al., *Protective effects of melatonin on long-term administration of fluoxetine in rats*. Exp Toxicol Pathol, 2017. **69**(8): p. 564-574.
155. Atli, O., et al., *Sertraline-induced reproductive toxicity in male rats: evaluation of possible underlying mechanisms*. Asian J Androl, 2017. **19**(6): p. 672-679.
156. Zhang, C., et al., *Influence of BCL2 gene in major depression susceptibility and antidepressant treatment outcome*. J Affect Disord, 2014. **155**: p. 288-94.
157. Djordjevic, A., et al., *Fluoxetine affects hippocampal plasticity, apoptosis and depressive-like behavior of chronically isolated rats*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012. **36**(1): p. 92-100.
158. Nahon, E., et al., *Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and protection against apoptotic cell death*. FEBS Lett, 2005. **579**(22): p. 5105-10.
159. Strandgaard, C. and M.G. Miller, *Germ cell apoptosis in rat testis after administration of 1,3-dinitrobenzene*. Reprod Toxicol, 1998. **12**(2): p. 97-103.
160. Camara, M.L., et al., *Fluoxetine-induced androgenic failure impairs the seminiferous tubules integrity and increases ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1): Possible androgenic control of UCHL1 in germ cell death?* Biomed Pharmacother, 2019. **109**: p. 1126-1139.
161. Gulbins, A., et al., *Antidepressants act by inducing autophagy controlled by sphingomyelin-ceramide*. Mol Psychiatry, 2018. **23**(12): p. 2324-2346.