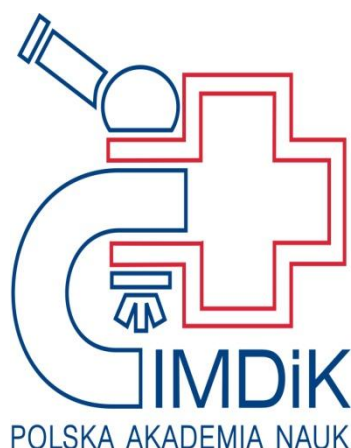


mgr inż. Mariusz Popek

**Udział transportera glutaminy SN1 w powstawaniu obrzęku mózgu
i zaburzeń w neuroprzeżywalności glutamatergicznej: rola w zmianach
obserwowanych w ostrej encefalopatii wątrobowej**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie: biologii medycznej**

Promotor: dr hab. Magdalena Zielińska



**Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN**

 Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

 **KNO**

Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący
2012-2017

 **NARODOWE
CENTRUM
NAUKI**

Warszawa 2018

STRESZCZENIE

Podwyższone stężenie amoniaku w surowicy krwi obserwuje się w przebiegu wielu zaburzeń metabolicznych, spośród których najczęściej spotykanym jest encefalopatia wątrobowa (EW). W EW, w wyniku dysfunkcji hepatocytów dochodzi do obwodowego gromadzenia się różnych związków szkodliwych tj: amoniaku, merkaptanów, fenoli, czy aminokwasów aromatycznych (tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny), które działając neurotoksycznie, powodują uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (Raabe, 1987; Giguère i wsp., 1984; Crossley i wsp., 1983; Norenberg, 1987). Typ ostry EW, z klinicznie obserwowanym gwałtownym przebiegiem, był przedmiotem mojego zainteresowania podczas badań zawartych w dysertacji. Najpoważniejsze objawy kliniczne ostrej EW to: zaburzenia neurotransmisji, które w późnych fazach choroby mogą objawiać się drgawkami i śpiączką oraz obrzęk mózgu prowadzący do śmierci pacjenta.

Patomechanizm EW jest wieloczynnikowy i obejmuje m.in. udział cytokin prozapalnych i stresu oksydacyjnego, jednak główną rolę przypisuje się podwyższonemu stężeniu amoniaku. Neurotoksyczne działanie amoniaku związane jest ze zmianami w neuroprzebieżności glutaminergicznej (Felipo i Butterworth, 2002) i wiąże się z nadmierną produkcją glutaminy (Gln), głównego produktu detoksykacji amoniaku, w reakcji amidacji Glu (Waniewski, 1992), która zachodzi w astrocytach. Gln wykazuje właściwości osmotyczne, a jej gromadzenie w komórkach powoduje wystąpienie nierównowagi osmotycznej i powstawanie cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu. Wysokie stężenie Gln przekłada się na zaburzenia cyklu Gln-Glu/GABA, który sprzęga metabolizm i funkcje astrocytów z neuronami. Zwiększona produkcja Gln i/lub nieprawidłowa dystrybucja aminokwasu pomiędzy komórkami może wpływać na syntezę neurotransmitterów: pobudzającego Glu oraz hamującego GABA. Mechanizm ten może tłumaczyć zatem podwyższone stężenie Glu obserwowane w warunkach ostrej EW lub hiperamonemii (Moroni i wsp., 1983; De Knegt i wsp., 1994; McArdle i wsp., 1996; Michalak i wsp., 1996; Hilgier i wsp., 1999).

Wydaje się, że przyczyną gromadzenia się Gln w astrocytach w warunkach ostrej EW jest zwiększona retencja aminokwasu w komórce spowodowana zaburzeniem jego transportu na zewnątrz komórki. Najważniejszym białkiem regulującym transport Gln z astrocytów jest SN1. Świadczą o tym jego właściwości: wysoka aktywność przy fizjologicznym stężeniu Gln,

zdolność do transportu Gln niezależnie od obecności innych aminokwasów (Mackenzie i Erickson, 2004) i korelacja wzrostu wydajności transportu Gln ze wzrastającym stężeniem wewnątrzkomórkowego Glu (Bröer i wsp., 2004). W szczurzym modelu ostrej EW wykazano spadek ilości białka SN1 (Zielińska i wsp.; 2014). Obserwacje te stały się jednym z punktów wyjścia do dalszych, bardziej szczegółowych badań, zgodnie z założeniem, że zmiany w ilości i aktywności transporterów mogą być jedną z przyczyn retencji Gln w komórkach, przyczyniając się tym samym do powstawania cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu, a także wpływać na neurotransmisję.

Postawiona w pracy hipoteza zakłada udział astrocytarnego transportera SN1 w retencji Gln w komórkach, co przyczynia się do wystąpienia obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym i zaburzeń neurotransmisji glutamatergicznej, dwóch klinicznie najpoważniejszych objawów ostrej EW.

Celami niniejszej pracy było: 1) Wykazanie obecności cytotoksycznej i naczyńopochodnej składowej obrzęku mózgu oraz zmian w parametrach elektrofizjologicznych w korze czołowej myszy w azoksymetanowym (AOM) modelu ostrej EW oraz 2) zbadanie, czy wyciszenie transportera glutaminy SN1 techniką *vivo-morpholino* u zwierząt zdrowych odtworzy: a) powstawanie obrzęku kory czołowej o charakterze cytotoksycznym oraz b) zmiany w parametrach elektrofizjologicznych obserwowane w modelu ostrej EW.

W mysim AOM modelu EW wykazano wzrost aktywności enzymów wątrobowych: aminotransferazy alaninowej i asparaginowej (ALT, AST) oraz podwyższone stężenie amoniaku i cytokin prozapalnych (IL-6, TNF- α) w surowicy, potwierdzając charakterystyczne cechy ostrej EW. Dodatkowo obserwowane spowolnienie ruchowe i stopniowy zanik odruchów neurologicznych wskazały, że model AOM odwzorowuje zmiany behawioralne odwzorowujące kolejne stadia EW obserwowane u pacjentów. Co więcej, stwierdzono zmiany w parametrach elektrofizjologicznych kory czołowej, tzn. obniżenie LTP, obniżenie amplitudy potencjałów polowych, zwiększenie wartości progowej dla generowania potencjału czynnościowego, a także obniżenie średniej częstotliwości i zwiększenie średniej amplitudy spontanicznych postsynaptycznych prądów pobudzających. Wyniki dokumentują szybkie pogarszanie się funkcji motorycznych i neurologicznych zwierząt AOM.

Badania obrzęku mózgu w modelu ostrej EW obejmowały analizę morfologiczną komórek przy wykorzystaniu emisyjnej mikroskopii elektronowej, w wyniku której wykazano, że ~20% ocenionych naczyń charakteryzowało się zmienionym morfologicznie śródbłonkiem, posiadającym liczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie oraz mikrokosmki na powierzchni luminalnej komórek. Pomiedzy komórkami śródbłonka widoczne były szczeliny wskazujące na nieszczelność połączeń ścisłych, co świadczyło o obecności naczyniopochodnej składowej obrzęku mózgu. Natomiast ~25% naczyń krwionośnych charakteryzowało się obecnością przynaczyniowych wypustek astrocytarnych z cechami obrzęku, o czym świadczyła m.in. jasna elektronowo cytoplazma, wskazując na obecność obrzęku o charakterze cytotoksycznym. Rozszczelnienie bariery krew-mózg w modelu AOM potwierdzono wykazując zwiększoną o ~400% przepuszczalność dla błękitu Evansa. Dodatkowo analiza wykorzystująca technikę rezonansu magnetycznego wykazała ~10% obniżenie wartości parametru pozornego współczynnika dyfuzji (ADC) świadczącego o słabszej dyfuzji cząsteczek wody w zmniejszonej przestrzeni międzykomórkowej kory czołowej. Powyższe dane kwantyfikują obecność obrzęku o charakterze cytotoksycznym. Nierównowagę w stężeniach związków osmotycznie czynnych w korze czołowej myszy AOM potwierdzają również: podwyższone stężenie Gln o ~37%, mioinozytolu o ~22%, łącznie analizowanego stężenia Gln i Glu o ~10% oraz obniżone o ~35% stężenie alaniny w porównaniu do myszy kontrolnych.

Hipotezę o udziale transportera SN1 w powstawaniu zmian w parametrach elektrofizjologicznych charakteryzujących neurotransmisję glutamatergiczną oraz obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym wspiera wykazana w korze czołowej myszy AOM obniżona ekspresja SN1 na poziomie mRNA oraz białka (o ~30%), a także funkcjonalne zaburzenie transportu Gln między komórkami (zależnego od systemu N obniżenia wychwytu i wyrzutu tego aminokwasu).

W celu zweryfikowania hipotezy o udziale selektywnie wybranego czynnika, jakim jest deficyt astrocytarnego transportera Gln SN1 w retencji Gln w komórkach, przekładającej się na zaburzenia neurotransmisji glutamatergicznej i wystąpienie obrzęku o charakterze cytotoksycznym, posłużono się modelem lokalnego wyciszenia białka, w którym wykorzystując technikę *vivo-morpholino*, we fragmencie kory czołowej myszy, selektywnie wyciszono transporter SN1. Technika Western Blot, a także analizą mikroskopową wykazano ~50% obniżenie poziomu białka SN1. Analiza parametrów elektrofizjologicznych

w wyciszonym fragmencie wykazała obniżenie amplitudy potencjałów polowych w szerokim zakresie intensywności stymulacji w odpowiedzi na bodziec, między neuronami warstwy V połączonymi horyzontalnie, obniżenie potencjału spoczynkowego neuronów warstwy II/III oraz powstanie tendencji w kierunku obniżenia wartości LTP indukowanego w połączeniach horyzontalnych. Dodatkowo analiza morfologiczna wyciszonego fragmentu kory czołowej udokumentowała, że ~40% naczyń krwionośnych charakteryzowało się obecnością przynaczyniowych wypustek astrocytarnych z cechami obrzęku o charakterze cytotoksycznym. Ten sam charakter obrzęku potwierdzono analizą NMR określając wartość współczynnika ADC. Dodatkowo, metodą mikrodializy wykonanej na swobodnie poruszających się zwierzętach, wykazano obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia Gln o ~40%, czemu towarzyszyło niezmienione stężenie tego aminokwasu w tkance, określające zarówno przestrzeń zewnątrzkomórkową jak i wewnątrzkomórkową (metoda spektroskopii ^1H). Zaobserwowano ~85% wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia tauryny, a także obniżenie stężenia Glu o ~15%, czemu współtowarzyszył ~22% wzrost stężenia fosfocholiny (^1H NMR).

Podsumowując, mysz AOM model ostrej EW, odzwierciedlający cechy późnej fazy ostrej EW u pacjentów, wykazywał zaburzenia neurotransmisji glutamatergicznej (badania behawioralne i elektrofizjologiczne) oraz wystąpienie dwóch składowych obrzęku mózgu (ultrastrukturalna analiza morfologiczna, analiza MRI, analiza ^1H NMR osmolitów). Obniżenie ekspresji białka SN1 i zaburzenia transportu Gln sugerują udział transportera SN1 w obserwowanych zmianach.

Lokalne wyciszenie transportera SN1 techniką *vivo-morpholino* spowodowało retencję Gln w astrocytach, a w konsekwencji wystąpienie cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu (ultrastrukturalna analiza morfologiczna, analiza MRI, analiza ^1H NMR i pomiar zewnątrzkomórkowych stężeń osmolitów). Co więcej, subtelne zmiany parametrów elektrofizjologicznych udokumentowały rolę transportera SN1 w utrzymaniu prawidłowej transmisji glutaminergicznej.

Wyniki badań pozytywnie zweryfikowały hipotezę zakładającą udział astrocytarnego transportera SN1 w retencji Gln, prowadząc do dysfunkcji astrocytów i neuronów, co może tłumaczyć analogiczne zmiany obserwowane w modelu ostrej EW. W przyszłości regulacja ilości i aktywności transportera SN1 może stać się cennym narzędziem terapeutycznym,

pozwalającym kontrolować rozwój obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym, jak również zaburzenia transmisji glutaminergicznej związanych z ostrą EW.