

Mgr inż. Marek Pawlik

**Methionine sulfoximine as a modulator of initial seizures
in the lithium-pilocarpine model
in juvenile rats**

**Metionino-sulfoksymina jako modulator inicjacji napadów
padaczkowych u młodych szczurów w modelu litowo-pilokarpinowym**

Doctoral thesis in the discipline of Medical Sciences,
in the form of monothematic collection of articles

Supervisor:

prof. dr. hab. Jan Albrecht

Auxiliary supervisor:

dr. Marta Obara-Michlewska



Defense of the doctoral dissertation before Scientific Council
of Mossakowski Medical Research Institute
Polish Academy of Sciences

Warsaw, 2022

Streszczenie (abstract in Polish)

Zachodząca w cyklu glutamina-glutaminian (GGC) przemiana glutaminy (Gln) do glutaminianu (Glu) odpowiedzialna jest za syntezę ok. 70 procent puli tego neuroprzekaźnika. Choć wzmożona transmisja glutaminergiczna jest stałym elementem napadów padaczkowych, mechanizm mobilizacji przekaźnikowej puli Glu w inicjacyjnej fazie choroby nie został dobrze poznany. Postawiono hipotezę, że zahamowanie aktywnej syntezy Gln, bezpośredniego prekursora Glu, mogłoby osłabić lub zatrzymać aktywność napadową mózgu w tej fazie. Aby zbadać tę hipotezę, młodym szczurom w litowo-pilokarpinowym modelu padaczki, podawano L-metionyl-D,S-sulfoksyminę (MSO) – swoisty inhibitor syntetazy glutaminy, lub sól fizjologiczną, po czym wywoływano napady drgawkowe przy użyciu agonisty receptora muskarynowego, pilokarpiny (Pilo). Przebieg napadów analizowano przez 1 godzinę od iniekcji Pilo, z wykorzystaniem behawioralnej skali Racine'a, EEG, EMG oraz biosensorów Glu umieszczonych w hipokampie; część zwierząt otrzymała również znakowane izotopowo astrocytarne lub neuronalne prekursory cyklu Krebsa, odpowiednio [1,2-¹³C]octan lub [U-¹³C]glukozę, w celu zbadania wpływu MSO i/lub Pilo na zmiany w przebiegu GGC. Po zakończeniu obserwacji zwierzęta były uśmiercane, a ich tkanka mózgowa wykorzystana była do oznaczeń biochemicznych i molekularnych. Przeprowadzono również oddzielną serię doświadczeń, z wykorzystaniem skrawków mózgowych, pobranych od zwierząt poddanych działaniu MSO, w których badano zmiany w wychwycie i wyrzucie [³H]D-asparaginianu ([³H]D-Asp), znakowanego trytem, niemetabolizowanego analogu Glu. Ekspresję mRNA kodującego białko wczesnej odpowiedzi, c-Fos, mierzono metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Wykazano, że zastosowanie MSO łagodzi napady drgawkowe, a także wyraźnie opóźnia ich wystąpienie, zarówno na poziomie behawioralnym, jak i elektrograficznym, nie łagodzi jednak współwystępującego z napadami wzrostu poziomu zewnątrzkomórkowego Glu w hipokampie. Analiza przemiany *in vivo* znakowanych ¹³C prekursorów metabolicznych ([U-¹³C]glukozy i [1,2-¹³C]octanu) do Gln i Glu przy użyciu chromatografii gazowej - spektrometrii masowej (GC-MS) nie wykazała istotnego wpływu MSO na ten proces. Zaobserwowano, że MSO znacząco osłabia wyrzutu ([³H]D-Asp), nie wpływając wyraźnie na jego wychwyt. Badania molekularne wykazały silną ujemną korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA c-Fos, a czasem dzielącym podanie Pilo od wystąpienia uogólnionego napadu drgawkowego, przy jednoczesnym braku zależności ekspresji od intensywności napadów. MSO wykazało tendencję do osłabienia odpowiedzi c-Fos na Pilo.

W sumie, przedstawione wyniki sugerują, że mechanizm opóźnienia i osłabienia napadów drgawkowych w modelu pilokarpinowym przez MSO nie jest związany z obniżeniem syntezy glutaminy, a raczej z bezpośrednim oddziaływaniem na mechanizmy uwalniania Glu z synapsy. Skuteczność przeciwdrgawkowego działania MSO sugeruje, że ten związek (lub jego pochodna) może stać się skutecznym narzędziem w ew. zapobieganiu i terapii najwcześniejszych napadów padaczkowych, zaś c-Fos pożytecznym markerem biochemicznym modulacji najwcześniejszej fazy inicjacji napadu.