

## STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. WERONIKI KRZYŻANOWSKIEJ:

### MODULACJA TRANSPORTERÓW UKŁADU GLUTAMINERGICZNEGO PRZEZ CEFTRIAKSON I N-ACETYLOCYSTEINĘ A ROZWÓJ TOLERANCJI MÓZGU NA NIEDOKRWIENIE

Udar mózgu jest jedną z głównych przyczyn śmierci, trwałego kalectwa i braku samodzielności osób dorosłych. Aż 85%-90% udarów mózgu to udar niedokrwienny, wywołany przerwaniem lub znacznym zmniejszeniem dopływu krwi do określonego obszaru mózgu, co prowadzi do uszkodzenia i śmierci komórek. Molekularne patomechanizmy udaru niedokrwiennego nie zostały w pełni wyjaśnione. Istotną rolę w patofizjologii niedokrwienia mózgu odgrywa zjawisko ekscytotoksyczności. W warunkach niedokrwienia poziom zewnątrzkomórkowego kwasu glutaminowego wzrasta, co jest związane z zahamowaniem zależnych od ATP pomp sodowo-potasowych utrzymujących odpowiednią polaryzację błon komórkowych. Zaburzeniu ulega również działanie transporterów glutaminianu odpowiedzialnych za usuwanie nadmiaru tego neuroprzekaźnika z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Prowadzi to do ciągłej stymulacji receptorów NMDA, otwarcia kanałów wapniowych i napływu wapnia do wnętrza neuronu. Ponieważ jony wapnia stanowią aktywator dla wielu energochłonnych szlaków biochemicznych komórki, dochodzi do szybkiego wyczerpania substancji energetycznych i śmierci komórek.

Obecnie nie ma specyficznego leczenia udaru mózgu. Zjawiskiem o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym może być hartowanie mózgu (*ang. preconditioning*), czyli możliwość indukcji tolerancji tkanki nerwowej na niedokrwienie. Bodziec potencjalnie uszkodzający, ale o niewielkim natężeniu, działa ochronnie w przypadku kolejnego, znacznie dłuższego epizodu niedokrwienia. Kliniknym odpowiednikiem hartowania przez niedokrwienie u ludzi jest najprawdopodobniej przejściowy epizod niedokrwienny (*ang. transient ischemic attack, TIA*).

Szczególnie dwa układy transportujące glutaminian: transporter glutaminianu 1 (GLT-1) i antyporter cystyna/glutaminian (xc-) wydają się mieć istotne znaczenie w niedokrwieniu mózgu i rozwoju tolerancji na niedokrwienie. Upośledzenie funkcjonowania GLT-1, kluczowego transportera glutaminianu, zwiększało uszkodzenie mózgu w wyniku niedokrwienia. Z kolei, po zastosowaniu bodźca hartującego, odnotowano wzrost ekspresji GLT-1. Podanie ceftriaksonu (CEF), antybiotyku  $\beta$ -laktamowego z grupy cefalosporyn,

będącego induktorem GLT-1, miało działanie protekcyjne w niedokrwieniu mózgu. Z kolei xc- jest hamowany przez wysokie stężenie glutaminianu, wywołane np. przez niedokrwienie, co prowadzi do zmniejszonej syntezy glutationu i wzrostu podatności na stres oksydacyjny. Jedną z substancji mogącą zwiększać ekspresję xc- jest także CEF. Z kolei N-acetylocysteina (NAC) lek o działaniu mukolitycznym może wzmacniać działanie xc-. Wykazano m.in. ochronne działanie NAC w modelu doświadczalnym niedokrwienia mózgu, choć mechanizm działania tego leku nie został jednoznacznie określony.

Celem pracy było określenie wpływu CEF i NAC na ekspresję transporterów układu glutaminergicznego GLT-1 i xc-, jak również określenia czy tej modulacji towarzyszy rozwój tolerancji mózgu na niedokrwienie. Wyniki były odnoszone do dwóch referencyjnych metod hartowania – przez krótkotrwałe niedokrwienie (IP) i chemicznego, przez podanie kwasu 3-nitropropionowego (3NP).

Badane leki podawano *i.p.* w dawce: CEF - 200 mg/kg, NAC - 150 mg/kg, raz dziennie przez pięć kolejnych dni. Trzy dni po zakończeniu podawania leków wywoływano 90-minutowe ogniskowe niedokrwienie mózgu przez zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (MCAO), filamentem wprowadzanym wewnątrznaczyniowo.

Analizowano nasilenie deficytu neurologicznego, wielkość zawału, ekspresję GLT-1 i xc- na poziomie mRNA i białka, lokalizację transporterów GLT-1 i xc- w komórkach oraz neurotransmisję glutaminergiczną w korze czołowej i hipokampie u badanych zwierząt.

Podania CEF i NAC, podobnie jak referencyjne czynniki hartujące (IP i 3NP) istotnie zmniejszyły wielkość ogniska zawału a także poziom deficytu neurologicznego wywołane przez 90-minutowe MCAO. Zmianom tym towarzyszyła modulacja ekspresji transporterów GLT-1 i xc- na poziomie mRNA i białka w korze czołowej, hipokampie i prążkowiu zwierząt. Zmiany ekspresji GLT-1 wywołane przez CEF, były analogiczne do zmian wywołanych przez IP i 3NP. Ponadto, wszystkie zastosowane strategie hartowania: CEF, NAC, IP i 3 NP obniżały stężenia glutaminianu w korze czołowej i hipokampie w czasie 90-minutowego MCAO. Wyniki barwień immunofluorescencyjnych, wskazują na nasilenie ekspresji GLT-1 na astrocytach przez zastosowanie CEF, IP i 3NP. Sugeruje to, że wzrost poziomu GLT-1 może odpowiadać za obniżenie stężenia glutaminianu w trakcie niedokrwienia u zwierząt hartowanych przez te czynniki.

Wyniki barwień sugerują również obniżenie ekspresji GLT-1 na astrocytach kory ruchowej i pola CA1 hipokampa pod wpływem 90-minutowego MCAO. Podanie CEF nasilało ekspresję

tego transportera, natomiast CEF obniżał ekspresję xc- na astrocytach analizowanych obszarów mózgu zwierząt, u których przeprowadzono 90-minutowe MCAO. Zastosowanie NAC przed długotrwałym ogniskowym niedokrwieniem obniżało ekspresję xc- na astrocytach kory ruchowej.

Obserwowane zmiany ekspresji GLT-1 i xc- prawdopodobnie mają na celu przywrócenie prawidłowego stężenia glutaminianu po niedokrwieniu mózgu. Uzyskane wyniki sugerują, że regulacja GLT-1 i xc- odgrywa ważną rolę w rozwoju tolerancji mózgu na niedokrwienie. Modulacja tych transporterów może stać się w przyszłości celem nowych strategii terapeutycznych udaru niedokrwiennego mózgu.

