

Streszczenie

Stwardnienie zanikowe boczne (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* – ALS) jest nieuleczalną chorobą neurodegeneracyjną. Cechuje ją postępująca dysfunkcja i degeneracja górnych oraz dolnych neuronów motorycznych, co prowadzi do odnerwienia mięśni docelowych, ich atrofii i w konsekwencji paraliżu. ALS jest chorobą rzadką o wciąż nieznaną etiologią i patogenezą. Z tego względu brak jest jednoznacznej i prostej metody pozwalającej na szybką i poprawną diagnozę w kierunku ALS, a rozpoznanie choroby opiera się na charakterystycznych objawach uszkodzeń górnych i dolnych neuronów ruchowych. Do tej pory brakuje leków, które w sposób skuteczny polepszałyby komfort oraz długość życia pacjenta.

Na podstawie obserwacji i analiz wyników pozyskanych ostatnio badań przeprowadzonych na materiale pobranym *post-mortem* oraz zwierzęcych modelach *in vivo* coraz więcej mówi się o decydującej roli astrocytów w inicjacji zdarzeń prowadzących do degeneracji neuronów w ALS oraz innych chorobach neurodegeneracyjnych. Astrocyty są najliczniejszą grupą komórek w centralnym układzie nerwowym, kilkakrotnie przewyższając liczbę neuronów. W zależności od panujących warunków oraz odbieranych sygnałów, aktywowane astrocyty mogą podjąć działania pro- jak i przeciwzapalne mające na celu ochronę komórek nerwowych. Dane literaturowe coraz częściej wskazują, iż każda zmiana funkcjonowania astrocytów niesie istotne konsekwencje dla neuronów. Jednocześnie badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych ujawniły, że stan wzmożonej astrogliozy poprzedza bądź występuje jednocześnie ze spadkiem liczby neuronów. Z tego względu uważa się, że przyczyną zaburzeń obserwowanych w ALS są pobudzone astrocyty.

W ramach prezentowanej pracy badania prowadzone były w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem technik biologii molekularnej umożliwiającą analizę zmian ekspresji genów zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Doświadczenia przeprowadzono na trzech liniach komórkowych pochodzenia ludzkiego: dwóch liniach nerwiaka płodowego SH-SY5Y i SK-N-BE(2)C oraz linii gwiazdziaka U373 MG. Komórki linii SH-SY5Y lub SK-N-BE(2)C przed właściwym eksperymentem, były hodowane z dodatkiem kwasu retinowego (ang. *All-trans retinoic acid* – ATRA) ($15\mu\text{M}$ – stężenie końcowe) przez 72 godziny. Po upływie okresu różnicowania, dotychczasowa pożywka hodowlana obu linii nerwiaka płodowego była zastępowana nadsącami hodowlanymi, zebranych wcześniej z komórek linii U373 MG stymulowanych uprzednio osoczami pacjentów chorych na sALS (U+#sALS) lub osoczem zdrowego dawcy (U+#Z), na okres kolejnych 48 godzin.

Na podstawie analizy zymografii substratowej stwierdzono zmieniony profil wydzielniczy enzymów proteolitycznych wyrażony zwiększoną aktywnością MMP-9 w nadsączach hodowlanych komórek linii U373 MG, które miały kontakt z osoczem chorych na sALS. Ponadto, analiza ekspresji białka metodą mikromacierzy białkowych wykazała zwiększoną ekspresję dla GDNF, TNF α , NT-3 oraz GTR oraz spadek ekspresji dla inhibitora metaloproteinaz TIMP-4 w tych komórkach.

Komórki linii SH-SY5Y oraz SK-N-BE(2)C wykazywały wzrost ekspresji mRNA dla NGFR w wyniku pośredniego kontaktu z osoczem chorych na sALS. Immunobloting dla NGFR wykazał zjawisko ograniczonej proteolizy receptora dla NGF w obydwu liniach oraz translokacji jego części cytoplazmatycznej do jądra komórkowego. Analiza ekspresji białka dla NGFR wykazała, że ograniczona proteoliza zachodzi niezależnie od aktywacji receptora NTRK1 w obu liniach nerwiaka płodowego. Zebrane wyniki dotyczących ekspresji mRNA oraz białka receptorów dla NGF wskazują, że obydwie linie zareagowały odmiennie na proces różnicowania z zastosowaniem kwasu retinowego.

Podsumowując, przedstawiony model badawczy może przysłużyć się dalszemu zdobywaniu i poszerzaniu wiedzy dotyczącej mechanizmów zachodzących w trakcie interakcji pomiędzy astrocytami i neuronami w układzie nerwowym, stanowiąc w tej postaci ich uproszczony model w warunkach *in vitro*. Ponadto, czynniki zawarte w osoczach chorych na sALS skutkują aktywacją astrocytów, która wyraża się ich podziałem na dwie populacje: pierwszą neuro-szkodliwą oraz drugą, neuro-protekcijną. W konsekwencji wzbudzona w ten sposób aktywność astrocytów może stać się przyczyną istotnych zaburzeń w funkcjonowaniu neuronów, co może wyrażać się między innymi zmianami w ekspresji i proteolizy receptorów dla czynników wzrostowych.

Prowadzenie eksperymentów w ściśle kontrolowanych warunkach zewnętrznych, pozwoli na uproszczenie złożonych interakcji panujących w centralnym układzie nerwowym pomiędzy neuronami, astrocytami i mikroglejem oraz dokładną analizę zmian zachodzących na poziomie molekularnym w każdej z populacji komórkowych z osobna.

Akceptuję

Franciszek