

Zakład Medycyny Laboratoryjnej
Katedra Biochemii Klinicznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Joanna Klimaszewska-Łata

Wrażliwość mikrogleju i neuronów cholinergiczných na bodźce cytotoksyczne

Praca doktorska

Praca wykonana
w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej
Katedry Biochemii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:
Prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz
Kierownik Zakładu i Katedry
Prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz

Gdańsk 2011

Praca finansowana z funduszy projektu MNiSW nr NN401029937, projektów GUMed ST57 i W128 oraz ze środków funduszy europejskich w ramach Działania 1.2 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



*Składam serdeczne podziękowania
Mojemu Promotorowi
Panu Profesorowi Andrzejowi Szutowiczowi
za okazaną mi życzliwość i wyrozumiałość,
za poświęcony mi czas,
jak również wszelkie wskazówki i nieocenioną pomoc
podczas wykonywania i redagowania tej pracy*

*Dziękuję całej mojej rodzinie, a w szczególności mojemu mężowi
lek. Jakubowi Łacie za wsparcie, cierpliwość i motywację oraz pomoc w
łączeniu zadań młodego naukowca i rodzica.*

~

*Dziękuję całemu Zespołowi Zakładu Medycyny Laboratoryjnej Katedry
Biochemii Klinicznej GUMed za pomoc, życzliwość i miłą atmosferę podczas
realizacji tej pracy.*

~

*Dziękuję Fundacji na rzecz Nauki Polskiej za wsparcie finansowe
projektu w ramach programu Pomost*

Pracę tę dedykuję Kubie, Jankowi i Antkowi

SPIS TREŚCI:

1.	STRESZCZENIE.....	12
2.	WSTĘP	15
2.1.	Fenotyp mikrogleju.....	15
2.1.1.	Morfologia mikrogleju.....	15
2.2.	Funkcje mikrogleju	17
2.2.1.	Aktywacja komórek mikroglejowych.....	17
2.2.1.1.	Lipopolisacharyd-czynnik aktywujący mikroglej.....	19
2.2.2.	Prezentacja antygeny	20
2.2.3.	Fagocytoza	21
2.2.4.	Produkcja rodników tlenowych	22
2.2.5.	Neurotropowe i neuroprotektoryjne funkcje mikrogleju.....	25
2.3.	Mikroglej w chorobach centralnego układu nerwowego	26
2.4.	Metabolizm energetyczny	27
2.5.	Komórki N9 i SN56 jako komórkowe modele doświadczalne neurodegeneracji	30
3.	CEL PRACY.....	34
4.	MATERIAŁY I METODY	35
4.1.	Odczynniki.....	35
4.2.	Materiały zużywalne	35
4.3.	Komórki mikroglejowe	35
4.4.	Komórki cholinergiczne	36
4.5.	Zamrażanie komórek	37
4.6.	Badane czynniki.....	37
4.6.1.	Lipopolisacharyd	37
4.6.2.	Kwas retinowy	38
4.6.3.	Dwumaślan-cAMP.....	38
4.7.	Ocena przeżywalności komórek	38
4.8.	Oznaczanie aktywności enzymów	38
4.8.1.	Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej	39
4.8.2.	Akonitaza	39
4.8.3.	Kompleks dehydrogenazy α -ketogluutaranowej	40
4.8.4.	Dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od NADP.....	40

4.8.5.	Liaza ATP-cytrynianowa.....	40
4.8.6.	Syntaza cytrynianowa.....	41
4.8.7.	Acetylotransferaza karnitynowa.....	41
4.8.8.	Acetylotransferaza cholinowa.....	42
4.9.	Badanie parametrów metabolizmu komórek.....	43
4.9.1.	Oznaczanie poziomu całkowitego acetylo-CoA.....	43
4.9.2.	Oznaczanie poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA.....	44
4.9.3.	Obliczanie poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA.....	44
4.9.4.	Oznaczanie całkowitego poziomu ATP w komórkach.....	44
4.10.	Wydzielanie tlenu azotu.....	45
4.11.	Ocena wskaźników reakcji zapalnej.....	45
4.11.1.	Oznaczanie stężenia interleukiny 6.....	45
4.11.2.	Oznaczanie stężenia czynnika martwicy nowotworów alfa.....	45
4.12.	Oznaczanie stężenia białka.....	44
4.13.	Metody statystyczne.....	46
5.	WYNIKI.....	47
5.1.	Parametry wzrostowe i metaboliczne komórek mikroglejowych N9 i neuronalnych SN56.....	47
5.2.	Wpływ lipopolisacharydu na komórki mikroglejowe N9.....	49
5.2.1.	Cytotoksyczność LPS.....	49
5.2.2.	Wpływ LPS na morfologię komórek N9.....	50
5.2.3.	Wpływ LPS na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego komórek N9.....	51
5.2.4.	Przewlekły wpływ lipopolisacharydu na metabolizm energetyczny komórek N9.....	55
5.2.5.	Wpływ LPS na wydzielanie azotynów przez komórki N9.....	58
5.2.6.	Wpływ LPS na wydzielanie interleukiny 6 oraz TNF- α przez komórki N9.....	61
5.3.	Fenotypowa modyfikacja komórek N9 przez kwas retinowy i cAMP.....	61
5.3.1.	Wpływ RA i cAMP na żywotność komórek N9.....	62
5.3.2.	Wpływ LPS na żywotność komórek N9.....	64
5.3.3.	Zależny od fenotypu wpływ LPS na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego komórek N9.....	66
5.3.4.	Zależny od fenotypu wpływ LPS na wybrane parametry metabolizmu energetycznego komórek N9.....	68

5.3.4.1. Acetylo-CoA	68
5.3.4.2. ATP	72
5.3.5. Wpływ RA i cAMP na syntezę azotynów przez komórki N9	73
5.3.6. Wpływ RA i cAMP na wydzielanie IL-6 i TNF- α przez komórki N9	75
5.4. Wpływ lipopolisacharydu na neurony cholinergiczne SN56	78
5.4.1. Neurotoksyczność cholinergiczna LPS	78
5.4.2. Wpływ LPS na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego komórek SN56	79
5.4.3. Wpływ LPS na wydzielanie azotynów przez komórki SN56	79
6. DYSKUSJA	81
6.1. Porównanie parametrów metabolicznych komórek N9 i SN56	81
6.2. Wpływ LPS na komórki mikroglejowe N9	82
6.2.1. Wpływ LPS na śmiertelność	82
6.2.2. Wpływ LPS na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego komórek N9	83
6.2.3. Wpływ LPS na metabolizm acetylo-CoA w mikrogleju N9	86
6.2.4. Wpływ LPS na poziom ATP	87
6.2.5. Wpływ LPS na funkcję (aktywność) mikrogleju	88
6.3. Wpływ kwasu retinowego na komórki mikrogleju N9	89
6.4. Wpływ cAMP na komórki N9	90
6.5. Wpływ LPS na neurony cholinergiczne SN56	92
6.6. Wpływ cAMP i RA na neurony cholinergiczne SN56	94
7. WNIOSKI	96
8. BIBLIOGRAFIA	97

WYKAZ RYCIN I TABEL UMIESZCZONYCH W TEKŚCIE

Ryciny:

Ryc.1. Rola reaktywnej mikroglejozy w samonapędzającym się cyklu śmierci neuronów.....	27
Ryc.2. Transportery glukozy i transportery monowęglowodanów w mikrogleju ssaków.....	28
Ryc.3. Krzywa wzrostu komórek mikrogleju N9 w warunkach kontrolnych.....	49
Ryc.4. Zależny od stężenia wpływ LPS na wzrost i stopień uszkodzenia komórek N9.....	50
Ryc.5. Wpływ LPS na zmiany morfologiczne w komórkach N9	51
Ryc.6. Wpływ LPS na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach N9.	52
Ryc.7. Wpływ LPS na aktywność akonitazy w komórkach N9.	53
Ryc.8. Wpływ LPS na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w komórkach N9.....	53
Ryc.9. Wpływ LPS na aktywność dehydrogenazy α -ketoglutaranowej w komórkach N9.....	54
Ryc.10. Wpływ LPS na aktywność liazy ATP-cytrynianowej w komórkach N9 ...	54
Ryc.11. Odwrotne korelacje pomiędzy frakcją komórek pochłaniających błękit trypanu, a aktywnością PDHC , KGDHC i akonitazy w komórkach N9 w obecności LPS	55
Ryc.12. Wpływ LPS na poziom całkowitego acetylo-CoA	56
Ryc.13. Wpływ LPS na poziom ATP w komórkach N9	57
Ryc.14. Odwrotna korelacja pomiędzy całkowitym poziomem ATP, a frakcją komórek N9 pochłaniających błękit trypanu w obecności LPS	57
Ryc.15. Wpływ lipopolisacharydu na syntezę azotynów przez komórki N9.	58
Ryc.16. Korelacje pomiędzy uszkodzeniem komórek, aktywnością PDHC, akonitazy i KGDHC, a akumulacją azotynów w komórkach N9 w obecności LPS ..	59
Ryc.17. Wpływ LPS na wydzielanie IL-6 i TNF- α przez komórki N9..	61
Ryc.18. Zależna od stężenia cAMP cytotoksyczność komórek N9.....	62
Ryc.19. Wpływ RA (0.001 mM) i cAMP (0.25 mM) na żywotność komórek N9... ..	63
Ryc.20. Wpływ kwasu retinowego i cAMP na morfologę komórek N9	64
Ryc.21. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01 μ g/mL) na uszkodzenie komórek N9.	65

Ryc.22. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na liczbę komórek N9 .	65
Ryc.23. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/ml) na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach N9.....	66
Ryc.24. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na aktywność akonitazy w komórkach N9.....	67
Ryc.25. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w komórkach N9.....	67
Ryc.26. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na aktywność dehydrogenazy α -ketoglutaranowej w komórkach N9.....	68
Ryc.27. Wpływ cAMP na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej oraz całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach N9.....	69
Ryc.28. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach N9..	70
Ryc.29. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na poziom acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym i cytoplazmatycznym w komórkach N9.....	71
Ryc.30. Odwrotna korelacja pomiędzy całkowitym poziomem acetylo-CoA a frakcją komórek uszkodzonych.	72
Ryc.31. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na całkowity poziom ATP w komórkach N9..	73
Ryc.32. Zależna od stężenia cAMP synteza azotynów przez komórek N9.....	74
Ryc.33. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na wydzielanie azotynów przez komórki N9.....	74
Ryc.34. Korelacja pomiędzy frakcją uszkodzonych komórek N9 a produkcją azotynów	75
Ryc.35. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.1µg/mL) na wydzielanie IL-6 przez komórki N9.....	76
Ryc.36. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.1µg/mL) na wydzielanie TNF- α przez komórki N9.....	76
Ryc.37. Korelacje pomiędzy syntezą IL-6 i TNF- α , a syntezą NO; między frakcją uszkodzonych komórek, a syntezą Il-6 i TNF- α oraz między całkowitym poziomem acetylo-CoA, a syntezą Il-6 i TNF- α	77

Ryc.38. Wpływ kwasu retinowego i cAMP na morfologę komórek SN56..... 78

Tabele:

Tabela 1. Wyściowy poziom wybranych enzymów i metabolitów metabolizmu energetycznego komórek mikroglejowych N9 i neuronów cholinergicznyc SN56.	48
Tabela 2. Wpływ LPS na utrzymanie wydzielania azotynów w czasie.....	60
Tabela 3. Wpływ LPS na komórki cholinergiczne SN56.....	80
Tabela 4. Wpływ różnych czynników różnicujących na parametry metaboliczne i enzymatyczne mikroglejowych komórek N9 oraz cholinergicznyc komórek neuronalnych SN56.....	94

OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

acetylo-CoA	acetylowany koenzym A
APC	komórki prezentujące antygen
BDNF	mózgowy czynnik neurotropowy
cAMP	cykliczny AMP
CAT	acetylotransferaza karnitynowa
ChAT	acetylotransferaza cholinowa
CS	syntaza cytrynianowa
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNTB	kwas 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowy
EDTA	wersenian dwusodowy
FBS	płodowa surowica bydlęca
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
IDH	dehydrogenaza izocytrynianowa
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukina
IL-1 β	interleukina 1 beta
iNOS	indukowalna izoforma syntazy tlenku azotu
KGDHC	kompleks dehydrogenazy α -ketoglutaranowej
LPS	lipopolisacharyd
M-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
MEM	środoisko wzrostowe dla komórek (Minimum Essential Medium)
MHC	główny układ zgodności tkankowej
NGF	czynnik wzrostu nerwów
NO	tlenek azotu
NOO ⁻	rodnik nadtlenkoazotynowy
O ₂ ⁻	anionorodnik ponadtlenkowy
OH ⁻	rodnik wodorotlenowy
ONOO ⁻	nadtlenkoazotyn
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAMP	wzorce molekularne związane z patogenami (ang. <u>P</u> athogen <u>A</u> ssociated <u>M</u> olecular <u>P</u> atterns)

PDHC	kompleks dehydrogenazy pirogronianowej
PGE ₂	prostaglandyna E2
PRR	receptory rozpoznające patogeny (ang. <u>P</u> athogen <u>R</u> ecognition <u>R</u> eceptors)
RA	kwasy retinowe
ROS	reaktywne formy tlenu
TLR-s	receptory Toll-podobne (ang. Toll Like Receptor)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworów alfa

1.STRESZCZENIE

W przedstawionej pracy porównano metabolizm energetyczny komórek mikroglejowych z cholinergicznymi komórkami neuronalnymi. Weryfikowano również hipotezę, że cytotoksyczny wpływ LPS na mikroglej i neurony cholinergiczne może być wywołany przez jego inhibicyjny wpływ na syntezę i metabolizm acetylo-CoA. Sprawdzono związek różnych fenotypów mikrogleju z jego funkcją i zmianami w metabolizmie energetycznym.

Komórki mikroglejowe w stanie spoczynkowym charakteryzowały się niższymi w stosunku do neuronalnych komórek cholinergicznymi aktywnościami PDHC, akonitazy oraz KGDHC odpowiednio o 32, 35 i 75%. Aktywność dehydrogenazy cytrynianowej NADP-zależnej była o 50% wyższa w komórkach mikroglejowych. Aktywności liazy ATP-cytrynianowej i acetylotransferazy karnitynowej w SN56 były odpowiednio 7 i 3 razy wyższe niż w komórkach N9. Z kolei całkowity poziom acetylo-CoA i ATP były w neuronach cholinergicznym odpowiednio o 33% niższe i o 84% wyższe niż w komórkach mikroglejowych. Jednocześnie poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA wyższy był w mikrogleju. Dane te wskazują, że niższe aktywności enzymów metabolizmu energetycznego w mikrogleju odpowiadają mniejszemu zapotrzebowaniu tych komórek na reszty acetylowe. Komórki cholinergiczne wykazują natomiast większe zapotrzebowanie na acetylo-CoA, który wykorzystywany jest nie tylko do produkcji energii, ale i do syntezy neuroprzekaźnika acetylocholin. Stąd pomimo wyższej aktywności enzymów i związanej z tym większej szybkości syntezy acetylo-CoA, całkowity poziom tego metabolitu był w komórkach cholinergicznym niższy.

Ekspozycja mikrogleju na LPS przez 24 godziny powodowała zależny od stężenia wzrost frakcji komórek uszkodzonych oraz spadki aktywności PDHC ($IC_{50}=0.177 \mu\text{g/mL}$), akonitazy ($IC_{50}=0.239 \mu\text{g/mL}$) oraz KGDHC ($IC_{50}=0.041 \mu\text{g/mL}$). Obniżał się również całkowity poziom acetylo-CoA do 60% wartości wyjściowej przy LPS $0.1 \mu\text{g/mL}$ oraz całkowity poziom ATP do 60% wartości wyjściowej przy LPS $0.05 \mu\text{g/mL}$. Wzrost frakcji komórek uszkodzonych i inhibicja enzymów pod wpływem LPS korelowały silnie ($r=0.847$, $p=0.009$; $r=0.866$, $p=0.002$; $r=0.887$, $p=0.001$; $r=0.944$, $p=0.0003$) ze wzrostem syntezy NO przez te komórki.

LPS w stężeniu 0.1 $\mu\text{g/mL}$ zwiększał wydzielanie Il-6 90-krotnie, a wydzielanie TNF- α 20-krotnie. Dane te wskazują, że inhibicja przez LPS enzymów metabolizmu energetycznego doprowadza do zahamowania przepływu metabolicznego reszt acetylowych przez cykl kwasów trójkarboksylowych co doprowadzałoby do ograniczenia sprzężonej z nim produkcji energii w łańcuchu oddechowym.

Różnicowanie komórek mikroglejowych przez 0.25 mM cAMP doprowadzało do spadku o 65% całkowitej liczby komórek przy ich 19% śmiertelności. Jednocześnie ponad 3 krotnie wzrastała produkcja NO. Nie zmieniało się wydzielanie Il-6 i TNF- α . Nie odnotowano wpływu cAMP na aktywność PDHC, akonitazy, IDH-NADP zależnej oraz KGDHC. Nukleotyd ten nie modyfikował hamującego wpływu LPS oraz RA na aktywność tych enzymów. Pod wpływem cAMP dochodziło natomiast do spadku o 52% całkowitego poziomu acetylo-CoA, jego frakcji mitochondrialnej (o 35%) oraz całkowitego poziomu ATP (o 31%). Wyniki te potwierdzają ostatnie doniesienia o aktywnym działaniu na mikroglej ligandów sygnałowych zwiększających wewnątrzkomórkowy poziom cAMP.

Kwas retinowy 1.0 $\mu\text{mol/L}$ zmniejszał wydzielanie NO, IL-6 oraz TNF- α przez komórki mikroglejowe aktywowane 0.01 $\mu\text{g/mL}$ LPS odpowiednio o 60, 70 i 65%. Sam RA nie wpływał ani na morfologię, ani na opisane wyżej parametry pomiarowe komórek N9. Obserwowano natomiast 39% spadek aktywności KGDHC oraz wzrost poziomu acetylo-CoA o 42% w stosunku do kontroli. W komórkach zaktivowanych cAMP, RA podnosił poziom acetylo-CoA, ATP przy jednoczesnym zmniejszeniu ich aktywności i śmiertelności. Dane te wskazują, że ochronne działanie RA polegałoby na zmniejszeniu siły reakcji zapalnych przy jednoczesnym wzroście komórkowych zasobów acetylo-CoA i ATP, stabilizujących mikroglej.

W niezróżnicowanych (KN) jak i zróżnicowanych (KR) kwasem retinowym i cAMP komórkach SN56, LPS w stężeniu 1.0 $\mu\text{g/mL}$ po 24-godzinnej hodowli nie wpływał ani na liczbę ani wielkość frakcji komórek uszkodzonych, jak również aktywność PDHC, akonitazy, KGDHC oraz IDH-NADP zależnej. Jednocześnie LPS nie powodował również zmian w morfologii komórek SN56, ani nie modyfikował ich całkowitego poziomu acetylo-CoA, jak również aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT). Nie stwierdzono wpływu LPS na wydzielanie azotynów przez te komórki. LPS nie wpływał na parametry żywotności i metabolizmu zarówno w zróżnicowanych jak i niezróżnicowanych neuronach cholinergicznym. Wskazuje to, że neurony cholinergiczne są niewrażliwe na bezpośrednie działanie tego czynnika

neurotoksycznego niezależnie od poziomu ekspresji fenotypu neuroprzekąźniczego. Może to być natomiast wpływ pośredni, wynikający z nadprodukcji NO przez mikroglej pobudzony *in vivo* LPS.

Praca ta dostarczyła nowych informacji na temat indywidualnych cech metabolizmu energetycznego, a zwłaszcza subkomórkowej dystrybucji acetylo-CoA w grupie komórek mikroglejowych, w powiązaniu ze zmianami ich fenotypu, w stanie fizjologii i patologii. Uzyskane przez nas i zamieszczone w tej rozprawie wyniki wskazują, że funkcja mikrogleju jest ściśle powiązana z jego metabolizmem energetycznym. Wywoływane różnymi bodźcami zmiany w metabolizmie acetylo-CoA w znacznym stopniu wpływają na żywotność i funkcję komórek mikroglejowych.

Nasze dane wskazują, że przy ocenie zmian poziomu metabolizmu energetycznego mózgu w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych należałoby brać pod uwagę indywidualne i wysoce zróżnicowane parametry metabolizmu acetylo-CoA w poszczególnych przedziałach komórkowych i subkomórkowych OUN.

2. WSTĘP

Mikroglej stanowi ok. 10% wszystkich komórek mózgu u człowieka i jest obok astrocytów, oligodendrocytów i ependymocytów jednym z czterech typów komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (Verkhatsky i Butt 2007). Komórki mikroglejowe należą do najmniejszych komórek centralnego układu nerwowego. Ich wielkość wynosi ok. 10-12 μ m (Kim i Nagai 2010), a liczba zbliżona jest do liczby neuronów. W mózgu człowieka gęstość mikrogleju zależy od regionu i wahać się może od 0.5 % do 16.6 % ogólnej liczby komórek. Najwyższa gęstość tych komórek jest w istocie białej, w moście Varola oraz rdzeniu przedłużonym; najniższa w istocie szarej (Mittelbronn i wsp. 2001). Określenie "mikroglej" odnosi się do komórek, które rezydują wewnątrz parenchymy układu nerwowego. Posiadają one wiele właściwości makrofagów innych tkanek, ale w swoim nie zaktywowanym stanie wykazują charakterystyczną niespotykaną gdzie indziej rozgałęzioną morfologię (Rock i wsp. 2004).

2.1. Fenotyp mikrogleju

Pochodzenie mikrogleju jest od wielu lat tematem ciągłej debaty. Prekursory mikrogleju zasiedlają mózg w okresie płodowym, oraz krótko po urodzeniu. Przyjmuje się, że progenitorowe komórki mikroglejowe powstające ze szpikowej linii progenitorowych komórek o pochodzeniu mezenchymalnym, w okresie ciąży migrują do rozwijającego się mózgu. Komórki te proliferują *in situ* i zasiedlają mózg przed zakończeniem jego rozwoju i zamknięciem bariery krew-mózg. U dorosłych populacja ta istnieje jako mikroglej miąższu mózgu. Druga, przejściowa populacja nazywana mikroglejem ameboidalnym pochodzi prawdopodobnie z monocytów i/lub płodowych makrofagów. Ten typ przeważa w czasie okresu okołoporodowego i pourodzeniowego (Chan i wsp. 2007).

2.1.1. Morfologia mikrogleju

Podczas zasiedlania OUN prekursorzy mikrogleju podlegają trzem procesom, w wyniku których powstają w pełni zróżnicowane komórki mikroglejowe. Są to : proliferacja z komórek prekursorowych, migracja do różnych regionów mózgu oraz różnicowanie z postaci ameboidalnej do rozgałęzionego fenotypu spoczynkowego. Liczne transformacje fenotypu morfologicznego i funkcjonalnego mikrogleju towarzyszące tym procesom określają tzw. plastyczność tych komórek.

Do powszechnie znanych cytokin stymulujących, działających na mikroglej "*in vitro*" zaliczyć można: interleukinę-3 (IL-3), IL-6, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) czy też czynnik wzrostu kolonii makrofagów 1 (CSF-1) (Sawada i wsp. 1990, Frei i wsp. 1986, Streit i wsp. 2000, Suzumura i wsp. 1990). Wszystkie te czynniki wzrostu mogą być produkowane lokalnie w OUN. (Schobitz i wsp. 1993, Farrar i wsp. 1989, Calvo i wsp. 1998, Dane i wsp. 1999).

W mózgu dorosłego człowieka mikroglej może występować w trzech formach czynnościowych: spoczynkowej-rozgałęzionej, zaktywowanej-nie fagocytydującej oraz ameboidalnej-fagocytydującej (Ling i Wong 1993). Opisywany jest również stan pośredni mikrogleju pomiędzy formą spoczynkową, a zaktywowaną tzw. mikroglej hiper-rozgałęziony (Streit i wsp. 1999). W mózgu, w okresie okołoporodowym dominującą formą jest mikroglej ameboidalny fagocytydujący, który w pierwszych tygodniach po urodzeniu przekształca się w postać rozgałęzioną spoczynkową (Hess i wsp. 2004). Podczas tej morfologicznej transformacji dochodzi do znacznej zmiany fenotypu komórek. Zmniejsza się poziom lub zanikają antygeny układu zgodności tkankowej MHC klasy I i MHC klasy II, lektyna, CD11b oraz CD45 (Tambuyzer i wsp. 2009).

Komórki mikroglejowe spoczynkowe rezydujące w istocie szarej są rozgałęzione, z małą zawartością okołojądrowej cytoplazmy oraz małym, gęstym heterochromatycznym jądrem i niskim poziomem metabolizmu energetycznego i wydzielniczego. Wypustki mikrogleju spoczynkowego są liczne, cienkie i rozchodzą się we wszystkich kierunkach. Każda komórka mikroglejowa posiada swoje własne terytorium o średnicy 15-30 μm , a wypustki sąsiadujących ze sobą komórek spoczynkowych nigdy się ze sobą nie kontaktują (Verkhatsky i Butt 2007). W warunkach "*in vitro*" mikroglej może migrować na powierzchni astrocytów z prędkością 20-35 $\mu\text{m}/\text{godz}$ (Hoek i wsp. 2000). Badania "*in vivo*" wykazały, że komórki te charakteryzują się wysoce dynamiczną plastycznością tzn. mogą ustawicznie wysuwać i cofać odgałęzienia w promieniu 80 μm , pełniąc nadzór nad otaczającą przestrzenią co kilka godzin, bez zmiany pozycji ciała komórki mikroglejowej (Nimmerjahn i wsp. 2005, Raivich 2005). Ruchliwość ta zależy od zewnątrzkomórkowego poziomu ATP (Davalos i wsp. 2005). Stan spoczynkowy mikrogleju w OUN jest inicjowany i podtrzymywany przez bezpośredni kontakt z komórkami neuronalnymi poprzez ligandy CD200 i CD200R. Ekspresja ligandu

CD200 zachodzi konstytutywnie na neuronach oraz śródbłonku OUN. W połączeniu z mikroglejowym błonowym receptorem CD200R stanowi sygnał hamujący dla mikrogleju (Hoek i wsp.2000). Procesy rozgałęziania mikrogleju są odwracalne zarówno w warunkach "*in vitro*" jak i "*in vivo*". Do czynników indukujących rozgałęzianie "*in vitro*" zaliczyć można witaminę E, DMSO, kwas retinowy, GM-CSF oraz M-CSF/GM-CSF (Heppner i wsp.1998, Giulian i wsp.1986, Fujita i wsp.1996).

Komórki mikrogleju spoczynkowego wykazują różnice morfologiczne w zależności od ich lokalizacji. W istocie szarej są one zazwyczaj zorganizowane promieniście w przeciwieństwie do istoty białej, gdzie cytoplazma komórek wydłuża się, wypełniając równoległe lub prostopadłe przestrzenie pomiędzy włóknami nerwowymi. Kształt mikrogleju spoczynkowego podlega zatem adaptacji do architektury neuronalnej poszczególnych regionów OUN (Tambuyzer i wsp. 2009).

Hiper-rozgałęzienie mikrogleju oznacza początek jego przerastania. Podczas ostrych uszkodzeń OUN jest to stan rzadki, charakterystyczny raczej dla subtelných zmian degeneracyjnych. Zauważany jest on również w starzejącym się mózgu człowieka. Większość różnego typu uszkodzeń neuronów powoduje przejście mikrogleju z formy spoczynkowej w zaktywowaną (Streit i wsp. 1999).

Po zadziałaniu czynników stymulujących forma spoczynkowa przekształca się w zaktywowaną (patrz rozdział 2.2.1.). Funkcjonalna zmiana zaktywowanego mikrogleju jest zawsze powiązana z morfologiczną transformacją, w wyniku której ciało komórki staje się większe, a wypustki mniej liczne oraz krótsze i grubsze (Kraft i wsp. 2009, Verkhratsky i Butt 2007). Komórki stają się również bardziej ruchliwe, zmieniają morfologię na ameboidalną, a w końcowym etapie aktywacji nabywają również zdolności do fagocytozy (patrz rozdział 2.2.3.)

2.2. Funkcje mikrogleju

2.2.1. Aktywacja komórek mikroglejowych

Mikroglej stanowi pierwszą linię obrony przeciwko patogenom przedostającym się do OUN i dlatego odgrywa istotną rolę podczas uszkodzeń mechanicznych i infekcji w OUN (Kreutzberg 1996). Spoczynkowy mikroglej bez kompletnej aktywacji może reagować i naprawiać jedynie subkliniczne uszkodzenia w mózgu (Hanisch i Kettenmann 2007).

W ludzkim mózgu, aktywacja mikrogleju i zapalenie są związane z infekcjami wirusowymi lub bakteryjnymi, chorobami autoimmunologicznymi (np. stwardnienie rozsiane), urazami głowy, udarami, stanami niedotlenienia, chorobami psychicznymi i neurodegeneracyjnymi. Czynniki aktywujące mikroglej to z jednej strony elementy infekcyjne takie jak fragmenty bakterii (np. lipopolisacharydy, LPS), antygeny wirusowe czy też agregaty własnych białek (priony, amyloid beta). Z drugiej strony sygnały do aktywacji mikrogleju mogą pochodzić od innych komórek mózgu. Zwiększone wydzielanie ATP, nukleotydów, neuropeptydów, czynników wzrostu czy neuroprzekazników przez uszkodzone neurony działa pobudzająco na mikroglej. Mikroglej aktywowany jest również poprzez sygnały pochodzące z astrocytów oraz sąsiednich zaktywowanych wcześniej komórek mikroglejowych. Mikroglej aktywują także związki przedostające się do mózgu przez uszkodzoną barierę krew-mózg takie jak: czynniki krzepnięcia, immunoglobuliny, albumina, czy trombina (Verkhatsky i Butt 2007). Mikroglej odpowiada zarówno na zmiany strukturalnej integralności tkanki mózgowej, jak i na bardzo subtelne zmiany w mikrośrodowisku takie jak zachwianie homeostazy jonowej.

Aktywacja mikrogleju jest procesem szybkim. Pierwsze zmiany biochemiczne zachodzą w komórce mikroglejowej w ciągu kilku minut od zadziałania sygnału, a pełna aktywacja tych komórek nie trwa dłużej niż kilka godzin (Verkhatsky i Butt 2007). Aktywacja mikrogleju jest zawsze powiązana z proliferacją komórek, migracją do miejsca uszkodzenia oraz charakterystyczną zmianą w ich morfologii, immunofenotypu i funkcji (Kreutzberg 1996). Początkowo zwiększa się gęstość kanałów potasowych. W kolejnym etapie dochodzi do zmiany ekspresji genów dla szeregu receptorów, do stymulacji syntezy wielu enzymów i białek strukturalnych oraz zmiany ruchliwości komórek. W zależności od rodzaju uszkodzenia, w zaktywowanym mikrogleju dochodzi do wzrostu poziomu czynników prozapalnych (interleukin-IL), czynników proliferacji, receptorów dla acetylowanych LDL, receptorów dla cytokin i chemokin, receptorów Toll-podobnych, receptorów dla mannozy, ATP i CGRP (calcitonin gene-related peptide), cyklooxygenazy-1 (Cox-1). Wzrasta ekspresja genów dla białek związanych z odpowiedzią immunologiczną (receptorów dla dopełniacza) oraz antygenów układu zgodności tkankowej MHC klasy II. (Nakajima i Kohsaka 2004, Priller i wsp. 1995, Walz i wsp. 1993).

Zaktywowany mikroglej migruje do miejsca uszkodzenia oraz wydziela szereg czynników rozpuszczalnych takich jak: cytotoksyny, neurotrofiny i czynniki

immunomodulacyjne oraz usuwa resztki komórek w procesie fagocytozy (Neumann i wsp. 2009, Chew i wsp. 2006). Zwiększa on przepuszczalność bariery krew-mózg dla szerokiej gamy związków drobno i wielkocząsteczkowych oraz obwodowych komórek immunologicznych takich jak makrofagi, oraz limfocyty różnych klas (Lu i wsp. 2001, Tonra i wsp. 2001, Schilling i wsp. 2003). Mikroglej jest zaangażowany w regulację środowiska tkanki mózgowej poprzez wpływ z jednej strony na zaprogramowaną śmierć neuronów, a z drugiej na ich przeżycie poprzez wydzielanie czynników troficznych i antyzapalnych (Block i wsp. 2007).

W stanie zaktywowanym mikroglej pełni szereg korzystnych funkcji niezbędnych do przeżycia neuronów. Jednak uważa się, że istnieje bardzo wąski przedział pomiędzy poziomami sygnałów promujących przeżycie i indukujących śmierć neuronów. Ta sama cytokina może w niskich stężeniach wywierać działanie ochronne, w wysokich zaś powodować uszkodzenie i śmierć neuronów i astrocytów.

2.2.1.1. Lipopolisacharyd-czynnik aktywujący mikroglej

Klasycznymi czynnikami aktywującymi mikroglej, używanymi w wielu badaniach "*in vitro*" są lipopolisacharydy (LPS). Te lipidowo-polisacharydowe heteropolimery stanowią amfifilowy składnik zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. LPS zaliczany jest do tzw. PAMP czyli "wzorców molekularnych związanych z patogenami" (pathogen associated molecular patterns). Oddziaływanie LPS odbywa się poprzez połączenie z "receptorami Toll-podobnymi" (TLR4) zaliczanymi do większej grupy receptorów rozpoznających patogeny: PRR (pathogen recognition receptors). Przy czym zanim LPS bakterii zwiąże się z TLR4, musi dojść do jego połączenia się z receptorem CD14. (Lee and Lee 2002, Tokarz-Deptuła i wsp.2006).

Zarówno "*in vitro*" jak i "*in vivo*" LPS powodował zmianę morfologii komórek mikroglejowych. Ciało komórki mikroglejowej oraz jego proksymalne wypustki przerastały, jednocześnie następowała utrata ich dystalnych rozgałęzień. Dochodziło również do wzrostu ekspresji integryn, antygenów MHC kl.I oraz B7.2 (Kloss i wsp. 2001). Stymulacja komórek mikrogleju N9 LPS powodowała wzrost poziomu transkryptu dla zmiataczy wolnych rodników, lektyn, ligandu Fas, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , chemokin, oksygenazy hemowej, katalazy, białek szoku cieplnego, neutrofilowego czynnika cytosolowego (NCF)-1, reduktazy 1 glutationu, dysmutazy ponadtlankowej (SOD)-2, receptora scavenger MARCO. Jednocześnie następował

spadek poziomu mRNA dla receptorów należących do PRR (TLR4), receptorów scavenger B1, receptora dla komplementu 1 i 3, receptora dla fosfatydyloseryny, oraz mannozowego receptora 1 (McKimmie i wsp.2006).

Po wpływie LPS dochodziło do wydzielania histaminy, oraz do aktywacji cyklooksygenazy 2 (COX2) i produkcji prostaglandyn (Kato i wsp.2001). Dochodziło również do stymulacji indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS), a w konsekwencji tego do wzrostu produkcji NO.

2.2.2. Prezentacja antygeny

Jedną z właściwości zaktywowanego ludzkiego mikrogleju jest jego zdolność transformacji do komórek prezentujących antygen (APC). Prezentacja antygeny możliwa jest dzięki interakcji pomiędzy receptorami CD40, CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2), których ekspresja zachodzi na powierzchni mikrogleju, a odpowiednimi receptorami na powierzchni limfocytów T (Slavik i wsp. 1999, van Kooten i wsp. 2000). Receptor B7 należą do rodziny powierzchniowych glikoprotein, a ich ekspresja na komórkach APC jest regulowana przez szereg cytokin. Do wzrostu ekspresji B7 dochodzi pod wpływem interleukiny 2 (IL-2), IL-4, interferonu gamma (IFN- γ) oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), a do spadku na skutek działania IL-10 (Azuma i wsp.1993, Ding i wsp. 1993). W stanie spoczynkowym ekspresja antygenów zgodności tkankowej MHC klasy I i II oraz stymulujących cząsteczek na powierzchni mikrogleju jest minimalna lub nieobecna (Stoll i wsp. 2006). Jednak zwiększa się ona na skutek stymulacji mikrogleju (Kreutzberg 1996). Związanie CD80 i CD86 na powierzchni mikrogleju z CD28 obecnym na powierzchni limfocytów T powoduje indukcję wydzielania cytokin i ich proliferację (Slavik i wsp.1999). Interakcja CD40 mikrogleju z CD40L limfocytów T doprowadza z kolei do wzrostu ekspresji CD80, CD86 i antygenów zgodności tkankowej MHC klasy II na powierzchni komórek mikroglejowych (van Kooten i wsp. 2000).

Zarówno "*in vitro*" jak i na zwierzęcym modelu stwardnienia rozsianego wykazano ekspresję ligandu Fas (FASL) na komórkach mikroglejowych, którego interakcja z receptorem Fas na limfocytach T doprowadza do zainicjowania apoptozy tych limfocytów (Frigerio i wsp. 2000, Kohji i wsp. 2000, Pender i Rist 2001).

2.2.3. Fagocytoza

Chociaż komórki mikroglejowe w mózgu pełnią funkcję makrofagów, ich parenchymalna lokalizacja i różnice w podstawowych funkcjach wyróżnia je od innych makrofagów związanych z błoną naczyń krwionośnych (perycytów, makrofagów oponowych i okołonaczyńniowych) (Polfliet i wsp. 2001, Thomas 1999). Mikroglej ameboidalny stanowi najwyższy stopień aktywacji tych komórek i wykazuje zdolność do fagocytozy zarówno "*in vitro*" jak i "*in vivo*" (Giulian i Baker 1986, Brockhaus i wsp. 1996). Właściwości takich mikroglej nabiera w przypadku zniszczenia lub/i śmierci otaczających go neuronów lub astrocytów. Czynnikiem inicjującym transformację mikrogleju do formy fagocytydującej jest w takich przypadkach prawdopodobnie uwalnianie fosfatydyloseryny lub lizofosfatydylocholino z obumierających komórek. Transformacja do formy fagocytydującej jest stanem nieodwracalnym, bez możliwości powrotu do stanu spoczynkowego (Streit i wsp. 1999).

Fagocytoza resztek komórkowych i obumarłych komórek jest niezbędna do ograniczenia reakcji zapalnej i prawdopodobnie zabezpiecza przed rozprzestrzenianiem się zniszczeń na nieuszkodzone regiony mózgu. Proces ten dotyczy nie tylko zniszczonych komórek własnych czy patogenów takich jak bakterie, ale także komórek pozamózgowych, dostających się do parenchymy mózgowej w warunkach patologicznych, podczas uszkodzenia bariery krew-mózg (np. erytrocyty, leukocyty) (Brockhaus i wsp. 1996).

Na powierzchni komórek mikroglejowych zlokalizowane są dwie grupy receptorów odgrywające kluczową rolę w procesie fagocytozy. Pierwsza z nich to rodzina receptorów rozpoznających drobnoustroje, takich jak receptory Toll-podobne (TLRs - Toll Like Receptors) biorące udział w usuwaniu mikroorganizmów oraz stymulujące odpowiedź prozapalną mikrogleju. Druga grupa to receptory rozpoznające materiał z apoptotycznych komórek mózgu np. receptory rozpoznające odsłoniętą fosfatydyloserynę (PRs) w błonie fosfolipidowej komórek apoptotycznych. Odgrywają one rolę w pochłanianiu przez mikroglej obumarłych komórek i stymulują przeciwzapalną odpowiedź fagocytydującego mikrogleju (Ravichandran 2003).

Badania "*in vitro*" wykazały, że u myszy izolowane komórki mikrogleju fagocytydującego są okrągłe, o średnicy 10-17 μm , mają liczne wodniczki oraz błoniastopodobne pseudopodia sięgające 25 μm i poruszają się z prędkością 5-15

$\mu\text{m}/\text{min}$. Nibynóżki służą do przytwierdzenia się do komórek i cząstek w celu ich późniejszej fagocytozy. Proces fagocytozy przebiega z wytworzeniem pęcherzyków fago- i pinocytowych o średnicy kilku μm , które wypełniają się komórkami, różnymi typami cząstek albo płynem, a następnie są wchłaniane do komórek. Podczas tworzenia tych pęcherzyków mikroglej znacznie zwiększa swoje rozmiary (Brockhaus i wsp. 1996). Komórki mikroglejowe posiadające zdolność do fagocytowania więcej niż jednej komórki, często używają w tym celu tego samego regionu komórki, co sugeruje istnienie w nich bieguna fagocytującego (Brockhaus i wsp. 1996).

W zaktywowanym mikrogleju dochodzi także do wzrostu ekspresji receptorów dla czynników dopełniacza (CR1,CR3,CR4) oraz receptorów Fc γ (I,II,III). Zwiększa to aktywność fagocytozy poprzez wiązanie dopełniacza i immunoglobulin (Peress i wsp. 1993, Barnum 1999).

2.2.4. Produkcja rodników tlenowych

W zależności od gatunku zwierzęcia mikroglej może produkować różne typy wolnych rodników (NO, O $2^{\bullet-}$, OH \cdot , NOO \cdot). Badania "*in vitro*" na ludzkich, mysich lub świńskich komórkach mikroglejowych, dowiodły, że zaktywowany mikroglej wszystkich tych trzech gatunków ma zdolność do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego (O $2^{\bullet-}$) (Hu i wsp.1995 i 1996). Natomiast produkcja NO dominuje u innych zwierząt. Do czynników pobudzających produkcję NO u gryzoni zalicza się cytokiny, trombinę, amyloid- β , zymosan, chromograninę, priony oraz ATP (Nakamura 2002). Stymulowany cytokinami lub lipopolisacharydem (LPS) ludzki mikroglej wydziela niewielkie ilości NO. Może to mieć związek ze słabą odpowiedzią genu dla indukowanej formy syntazy tlenku azotu (iNOS) na sygnały aktywacyjne u ludzi (Rock i wsp. 2004, Brosnan i wsp. 1994, Ding i wsp. 1997, Janabi i wsp. 1996).

Mikroglej zwiększa własną produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) w wyniku aktywacji przez szereg czynników prozapalnych takich jak: lipopolisacharyd bakteryjny (LPS), endogenne białka-toksyny (amyloid- β , α -synukleina) pro- i antyzapalne cytokiny i/oraz czynniki wzrostu (Block i Hong 2005, Chao 1995). Również fagocytoza sama w sobie indukuje produkcję wolnych rodników, które przyspieszają degradację zfagocytowanych antygenów i fragmentów rozpadłych komórek. Negatywny efekt ROS produkowanych przez mikroglej został wykazany

między innymi na modelu niedotlenienia mózgu, w przypadku chorób demielinizacyjnych oraz choroby Alzheimera (Love 1999, Smith i wsp. 1999, McDonald i wsp. 1997).

Produkcja ROS w zaktywowanym mikrogleju odbywa się zarówno wewnątrz jak i na powierzchni komórki. ROS w fagocytach pochodzić mogą z kilku źródeł: peroksydazy znajdującej się na powierzchni błony komórkowej (NADPH oksydaza EC 1.6.2.4.), wewnątrzkomórkowej peroksydazy oraz procesów oksydacyjnych w mitochondriach. Błonowa NADPH oksydaza jest głównym źródłem zewnątrzkomórkowych ROS w komórkach aktywowanego mikrogleju (Block i Hong 2005).

NADPH oksydaza składa się z wielu podjednostek, w tym z cytochromu b558. W mikrogleju spoczynkowym podjednostki budujące NADPH oksydazę są rozmieszczone pomiędzy cytoplazmą a błonami pęcherzyków i organelli wewnątrzkomórkowych (Babior 2000). Kiedy komórka mikroglejowa jest aktywowana, cytosolowe podjednostki (p40, p47, p67, Rac2) migrują w kierunku błony komórkowej gdzie łączą się z podjednostkami błonowymi (p22 i gp91), co doprowadza do aktywacji tego enzymu. Zaktywowana szeregami czynników (m.in. TNF- α , IL-1 β , chemokiny, amyloid- β , ATP, LPS) NADPH oksydaza, zwiększa stężenie anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet -}$) w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Block i Hong 2005, Babior 2000). Ten pod wpływem dysmutazy ponadtlenkowej przechodzić może w nadtlenek wodoru (H_2O_2) lub reaguje z NO tworząc wysoko-reaktywny rodnik nadtlenkoazotynowy (NOO^{\bullet}) (Bal-Price i Brown 2002). Udowodniono kluczową rolę aktywacji oksydazy NADPH w neurotoksyczności wywoływanej takimi toksynami jak LPS (Qin i wsp. 2004), amyloid- β (Qin i wsp. 2002), substancja P (Block i wsp. 2006), trombina (Choi i wsp. 2005), alfa-synukleina (Zhang i wsp. 2005). Wielu badaczy uważa jednak, że ani sama aktywacja oksydazy NADPH, ani sama nadprodukcja NO przez iNOS nie są wystarczające do indukowania neurotoksyczności. Dopiero w przypadku aktywacji obu tych szlaków jednocześnie ma dochodzić do mediowanej przez NOO^{\bullet} apoptozy neuronów. Istnienie tego skojarzonego mechanizmu wykazano w neurodegeneracji indukowanej IL-1 β , TNF- α , prionami, LPS-em, IFN- γ czy ATP (Mander i Brown 2005).

NADPH oksydaza jest również ważnym elementem sygnalizacji komórkowej. Wykazano, że enzym ten może brać udział w aktywacji komórek mikroglejowych

po stymulacji gangliozydami (Min i wsp. 2004). Z kolei proliferacja i zmiana w morfologii mikrogleju regulowana jest przez H_2O_2 syntetyzowany przez oksydazę NADPH (Mander i wsp.2006, Qin i wsp.2004). Odbywa się to na drodze inhibicji fosfatazy tyrozynowej przez H_2O_2 (Chan i wsp. 2009). W końcu NADPH oksydaza reguluje ekspresję genów dla niektórych czynników prozapalnych (Qin i wsp.2004). Wykazano również, że wzmocnienie procesu zapalnego odbywać się może na drodze aktywacji metaloproteinaz przez H_2O_2 (Brown i Neher 2010).

Produkowane wewnątrzkomórkowo ROS są niezbędne do utrzymania funkcji prozapalnych przez mikroglej oraz do jego przeżycia. Te reaktywne formy tlenu działają jako drugi przekaźnik informacji. Oddziaływując na kinazy białkowe (kinaza białkowa C, MAPK, NFκB) i czynniki transkrypcyjne wpływają one na ekspresję genów w komórkach mózgowych (Block i wsp.2007, Guyton i wsp. 1996, Konishi i wsp. 1997, Schreck i wsp.1991).

W normalnie funkcjonujących komórkach mikroglejowych, ROS utrzymywane są na nie cytotoksycznym poziomie dzięki istnieniu komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych. Zaburzenie mechanizmów regulacji wewnątrzkomórkowej syntezy ROS w mikrogleju zwiększa ich zawartość do poziomu wzmacniającego ekspresję genów dla czynników prozapalnych.

Głównym źródłem NO w mikrogleju jest indukowalna izoforma syntazy tlenu azotu (iNOS). Ekspresja iNOS w mikrogleju może być utrzymywana na niskim poziomie co udowodniono w badaniach "*in vitro*" (Mander i wsp.2006) i "*in vivo*" (Han i wsp. 2002) . Śmierć okolicznych neuronów była wtedy minimalna lub nieobecna. Wykazano, że w niskich stężeniach NO pochodzące z iNOS może nawet wykazywać działanie cytoprotekcyjne poprzez blokowanie śmierci komórek mózgowych (Cho i wsp. 2005). Wysoki poziom NO indukuje natomiast śmierć neuronów poprzez inhibicję mitochondrialnej oksydazy cytochromowej w neuronach (Bal-Price i Brown 2001, Brown i Cooper 1994). Znana jest interakcja NO z centrami żelazowo-siarkowymi wielu enzymów, w tym enzymów mitochondrialnych i lipooksygenaz. NO powodował inhibicję szeregu enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych w modelach neuronalnych komórek przegrody mózgu myszy (Bielarczyk i wsp. 2006). Inhibicja łańcucha oddechowego w neuronach przez NO powoduje ich depolaryzację i wydzielanie glutaminianu doprowadzając do ich ekscytotoksycznego pobudzenia za pośrednictwem receptora NMDA (Golde i wsp. 2002).

2.2.5. Neurotropowe i neuroprotektoryjne funkcje mikrogleju

Zarówno w warunkach "*in vitro*" jak i "*in vivo*" wykazywano zdolność komórek mikroglejowych do wywierania działania neurotroficznego na otaczające komórki. Dodanie kondycjonowanej mikroglejowej pożywki wzrostowej do hodowli neuronów kory mózgu powodowało zwiększenie ich przeżycia i wzrost. Wpływało ono aktywująco na wychwyt i zawartość dopaminy oraz ekspresję genów dla hydroksylazy tyrozynowej w neuronach śródmózgowia (Nagata i wsp.1993, Nakajima i wsp. 1989). Wykazano również wzrost aktywności acetylotransferazy cholinowej, a więc różnicowanie przez mikroglej neuronów cholinergicznym (Jonakait i wsp. 2000).

W komórkach mikroglejowych jak również w ich pożywkach pohodowlanych wykazano obecność szeregu cytokin neurotropowych takich jak: transformujący czynnik wzrostowy beta (TGFβ1, TGFβ2), glejowy czynnik neurotropowy (GDNF), interleukinę 6 (IL-6), IL-3, rzęskowy czynnik neurotropowy (CNTF), czynnik hamujący białaczkę (LIF) oraz czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF-α) (Nakajima i Kohsaka 2004). Dowiedziono wpływu tych cytokin na dojrzewanie, rozwój oraz różnicowanie komórek OUN, przeżycie uszkodzonych neuronów, aktywność enzymów w komórkach neuronalnych oraz formowanie blizn glejowych (Kiefer i wsp.1993, Penkowa i wsp.1999, Sendtner i wsp.1991, Michnikawa i wsp.1992, Cheng i wsp.1994). Neuroprotektoryjną rolę wobec neuronów oraz oligodendrocytów, jak również wpływ na ich dojrzewanie i różnicowanie przypisuje się również czynnikom wzrostu wydzielanym przez mikroglej. Są to: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) oraz plazminogen (Nakajima i Kohsaka 2004). Mikroglej wykazuje ekspresję mRNA oraz produkcję czynnika wzrostu nerwów (NGF), mózgowego czynnika neurotropowego (BDNF), neurotrofiny 3 (NT-3) oraz neurotrofiny 4/5 (NT-4/5) (Elkabes i wsp. 1996, Miwa i wsp.1997).

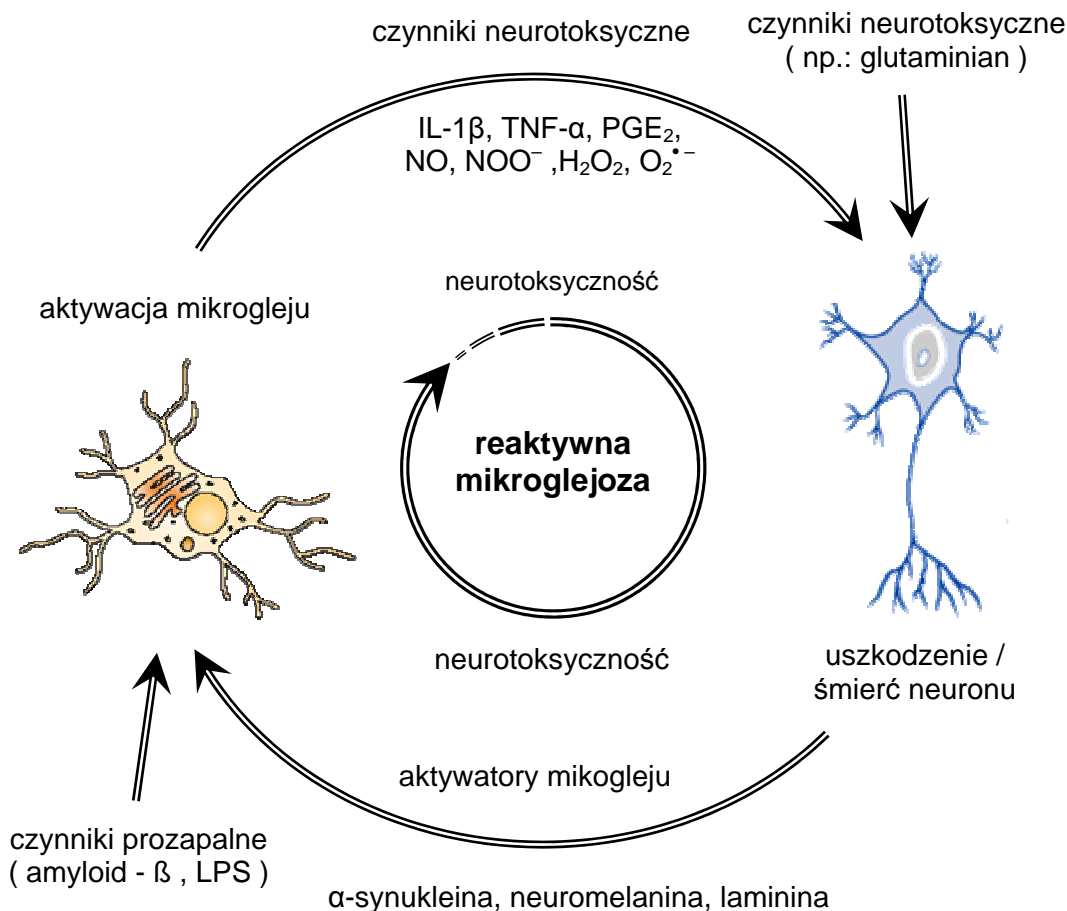
Na modelu kontrolowanego urazu kory mózgu oraz ostrego uszkodzenia neuronów ruchowych udowodniono zdolność mikrogleju do usuwania glutaminianu z przestrzeni synaptycznych. Możliwe jest to dzięki zwiększaniu gęstości transporterów dla glutaminianu GLT-1 (glutamate transporter-1) oraz GLAST (glutamate-aspartate transporter) na powierzchni komórek mikroglejowych w warunkach patologicznych (van Landeghem i wsp. 2001, Lopez-Redondo 2000).

Jeszcze inną neuroprotekcijną funkcją mikrogleju jest ochrona neuronów przed stresem oksydacyjnym. Mikroglej obniża bowiem produkcję rodników tlenowych dzięki zdolności do pochłaniania nadmiaru jonów żelaza oraz usuwania peroksydowanych błon komórkowych i nitrozylowanych białek (Srebro i Dziobek 2001). Mikroglej bierze również udział w synaptogenezie. We wczesnych stadiach rozwojowych wykazuje on ekspresję trombospondyn- białek zdolnych do indukowania synaptogenezy. Dodatkowo udowodniono, że wydzielany przez mikroglej BDNF reguluje właściwości synaps w rdzeniu kręgowym (Bessis i wsp.2007).

2.3. Mikroglej w chorobach centralnego układu nerwowego

Neurotoksyczne działanie mikrogleju ma związek z patogenezą wielu chorób neurodegeneracyjnych w tym: choroby Alzheimera, Parkinsona, stwardnienia rozsianego, stwardnienia zanikowego bocznego, choroby Huntingtona czy choroby Picka (Schlachetzki i Hüll 2009, Rogers i wsp. 2007, Takeuchi i wsp.2006, McGeer i wsp.2002, Sapp i wsp. 2001, Schofield i wsp.2003). Aktywację mikrogleju stwierdza się też w udarach i stanach niedotlenienia mózgu.

Negatywna i samopowielająca się reakcja mikrogleju na uszkodzenie tkanki mózgowej nazywana jest "reaktywną mikroglejozą" (Block i wsp. 2007). Do nadmiernej i szkodliwej w skutkach aktywacji mikrogleju może dochodzić poprzez dwa sygnały. Z jednej strony mikroglej może być stymulowany przez toksyny znajdujące się w otaczającym środowisku lub endogenne białka. Doprowadza to do nadprodukcji neurotoksycznych czynników prozapalnych. Z drugiej strony bodźcem aktywującym jest samo uszkodzenie komórek neuronalnych prowadzące do reaktywnej mikroglejozy. Proces ten wywiera negatywny wpływ na otaczające neurony doprowadzając do samopowielającego się błędnego cyklu śmierci neuronów (Ryc.1.). Uważa się, że kluczowym elementem reaktywnej mikroglejozy jest produkcja przez mikroglej reaktywnych form tlenu. Aktywacja NADPH oksydazy powoduje wzrost produkcji zarówno zewnątrzkomórkowych (potencjalnie toksycznych dla neuronów), jak i wewnątrzkomórkowych (wzmagających produkcję prozapalnych czynników o potencjale cytotoksycznym) ROS.



Ryc.1. Rola reaktywnej mikoglejozy w samonapędzającym się cyklu śmierci neuronów.

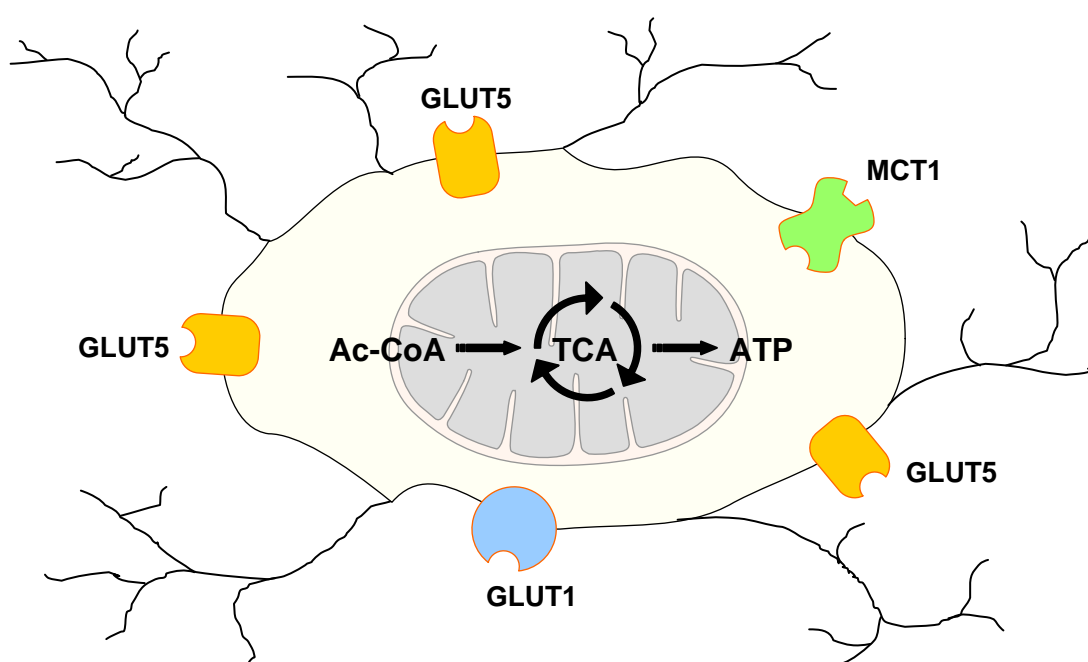
Na podstawie Block i wsp. 2007

Skróty: LPS-lipopolisacharyd, IL-1 β - interleukina 1 beta, TNF- α –czynnik martwicy nowotworów alfa, PGE₂- prostaglandyna E2, NO- tlenek azotu, NOO⁻- rodnik peroksyazotynowy, H₂O₂- nadtlenek wodoru, O₂⁻- anionorodnik ponadtlenny

2.4. Metabolizm energetyczny

W warunkach fizjologicznych głównym substratem energetycznym dla OUN jest glukoza. Za dostarczenie glukozy z krążenia ogólnego do mózgu odpowiadają transportery glukozy Glut1 (55 kDa) (glucose transporter) znajdujące się w komórkach endotelialnych mikrokrążenia bariery krew-mózg. Chociaż transportery Glut1 (45 kDa) zlokalizowane są również na powierzchni komórek mikoglejowych to ich gęstość jest stosunkowo niewielka. Zagadkowa jest rola transporterów Glut5,

których obecność wykazano wprawdzie na komórkach mikroglejowych, ale przypisuje się im większe powinowactwo do fruktozy niż glukozy (Simpson i wsp. 2007, Payne i wsp. 1997) (Ryc.2). W komórkach mikroglejowych wykazano również obecność transporterów MCT1 (monokarboxylate transporters) przenoszących mleczan, pirogronian, acetoctan i β -hydroksymaślan- substratów mogących także stanowić alternatywne źródło acetylo-CoA w mózgu (Simpson i wsp. 2007). Tak więc mikroglej w porównaniu z neuronami i astroglejem ma stosunkowo ubogi profil transporterów dla substratów energetycznych.



Ryc.2. Transportery glukozy i transportery monowęglowodanów w mikrogleju ssaków.

Skróty: GLUT1- transporter glukozy typu 1; GLUT5- transporter glukozy typu 5; MCT1- transporter monowęglowodanów; Ac-CoA- acetylowany koenzym A; TCA- cykl kwasów trójkarboksylowych; ATP-adenozynotrifosforan

Podczas glikolitycznej przemiany zachodzącej w cytoplazmie komórek, glukoza ulega przemianie do pirogronianu. Ten po wejściu do mitochondriów metabolizowany jest przy udziale kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC) do acetylo-CoA. Ta nieodwracalna reakcja zachodzi w macierzy

mitochondriów i łączy ze sobą glikolizę z cyklem kwasów trójkarboksylowych. Niemal 97% puli całkowitego acetylo-CoA w komórkach jest zużywane do produkcji energii w cyklu kwasów trójkarboksylowych, a jedynie niewielka część jest transportowana do cytoplazmy, gdzie zużywana jest do procesów syntezy.

O ile są badania próbujące oceniać metabolizm energetyczny komórek neuronalnych i astroglajowych to nie ma w literaturze żadnych danych dotyczących dystrybucji acetylo-CoA w przedziałach subkomórkowych mikrogleju w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. W szczególności brak jest danych dotyczących zmian w żywotności i funkcji tych komórek w powiązaniu ze zmianami metabolizmu acetylo-CoA w warunkach ekspozycji na bodźce neurodegeneracyjne.

Jak dotąd próbowano o metabolizmie energetycznym mikrogleju wnioskować na podstawie wyglądu mitochondriów. Badania *in vitro* na szczurzym mikrogleju przy użyciu mikroskopii elektronowej wykazały, że pobudzenie mikrogleju LPS (100 ng/mL) znacznie wpływało na morfologię mitochondriów. Mitochondria stawały się wydłużone, o kształcie igły, litery "U" lub podobne do otwartych pierścieni z podłużnymi grzebieniami. Mitochondria często układały się równolegle do podłużnej osi komórek, a w niektórych komórkach tworzyły formę siateczki. Były przy tym mniejsze, liczniejsze, z wystającą błoną wewnętrzną i z bladym matrix. Wewnątrzgrzebieniowe przestrzenie były ledwo zauważalne (Banati i wsp. 2004). Dla porównania w mikrogleju nie pobudzonym mitochondria miały kształt pofałdowanych grzebieni, z obszernymi wewnątrzgrzebieniowymi przestrzeniami zatopionymi w elektronowo gęstej jednorodnej macierzy (Banati i wsp. 2004). Podejrzewa się, że przejście mikrogleju z formy spoczynkowej w zaktywowaną może być powiązane ze znaczącym wzrostem zużycia energii i funkcjonalnych zmianach w mitochondriach. Mitochondria o podobnej morfologii były obserwowane w tkankach ssaków z wysoką syntezą białek (gruczoł sutkowy). Zauważono wtedy, że organella te stają się ruchliwe, a zmiana w ich kształcie związana jest z ruchem wewnątrz komórek (Lee i wsp. 1979). W ptasim nabłonku siatkówki również przeważają mitochondria pleomorficzne o kształcie pierścieni, które zanikają podczas degeneracji siatkówki, co interpretuje się jako dowód na to, że zmiana w kształcie mitochondriów jest ściśle powiązana ze zużyciem energii (Lauber 1982). Bereiter-Hahn (1990) postulował, że istnieje ścisła zależność pomiędzy morfologią mitochondriów, a stanem energetycznym tych organelli. Według powyższych obserwacji, mitochondria w nie pobudzonym mikrogleju

wykazują niską aktywnością oddechową (gęsta elektronowo macierz i obszerne przestrzenie międzygrzebieniowe), w przeciwieństwie do wysoce aktywnych mitochondriów (blada macierz i małe przestrzenie). Jednocześnie autor ten uważa, że liczba mitochondriów zależy od fazy cyklu w jakim znajduje się komórka. Tak więc zwiększenie liczby mitochondriów w zaktywowanym mikrogleju może wynikać z pobudzenia proliferacji tych komórek. (Bereiter-Hahn 1990).

Wykazano również, że na skutek nadmiernej aktywacji mikrogleju i wzrostu produkcji ROS, dochodzi w tych komórkach do spadku aktywności dehydrogenazy pirogronianowej, akonitazy, dehydrogenazy α -ketoglutaranowej, oksydazy cytochromowej (kompleks IV łańcucha oddechowego), oraz poziomu ATP (Richards i wsp. 2006, Tretter i Adam Vizi 2000, Park i wsp. 1999, Moss i Bates 2001). Wymaga sprawdzenia czy spadek aktywności dehydrogenazy pirogronianowej powoduje zubożenie komórek w acetylo-CoA.

2.5. Komórki N9 i SN56 jako komórkowe modele doświadczalne neurodegeneracji.

Komórki N9 są klonalnymi mysimi komórkami mikroglejowymi (microglioma). Hodowla ta powstała poprzez wyizolowanie komórek mikroglejowych z mózgow 13-dniowych zarodków i unieśmiertelnienie ich na drodze transfekcji retrowirusem 3RV niosącym aktywny onkogen v-myc (Righi i wsp. 1989).

Używana przez nas linia mikroglejowych komórek N9 jest dobrze scharakteryzowana. Cechuje się ona wysokim poziomem antygenów układu zgodności tkankowej MHC klasy I i II, jak również czynników kostymulujących CD8, CD19, CD28, CD40, CD45, CD80, CD86 i CD152. Komórki te wykazują także wysoką ekspresję receptorów dla IFN- γ (CD119), TNF- α (CD120a i CD120b) oraz związanych z inicjacją apoptozy receptorów Fas (CD96) oraz FasL (CD178). Dodatkowo komórki N9 posiadają receptory TOLL-like (TLR1, 2, 4, 7, 9), receptory dla komplementu (CR1, CR3), receptory scavenger (MARCO), CD14, jak również Fc receptory (Fc γ RI, Fc γ RII i Fc γ RIII). Wykazano obecność transkryptów dla TGF- β , chemokin (CCL3, CCL4) oraz genów związanych z fagocytozą (NCF1, NCF2), katepsyny D oraz cyklooksygenazy (COX-1, COX-2). W komórkach N9 zidentyfikowano geny związane ze stresem oksydacyjnym: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1 i SOD-2), geny związane z syntezą glutationu (syntetazą

glutationu), białka szoku cieplnego oraz oksygenazy hemowej (McKimmie i wsp. 2006, Dimayuga i wsp. 2005,).

Wszystko to dowodzi posiadania przez linię N9 fenotypu komórek immunokompetentnych. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że linia komórkowa N9 była używana w wielu badaniach nad biologią mikrogleju (Zhao i wsp. 2011, Zhang i wsp. 2003, Lorenz i wsp. 2003, Lockhart i wsp. 1998, Ferrari i wsp. 1996, Meda i wsp. 1995). Te właściwości uzasadniały wybór przez nas linii mikrogleju N9 jako modelu do badań metabolizmu energetycznego w tej grupie komórek.

Z kolei użyte do doświadczeń komórki neuronalne SN56B5.G4 są hybrydami utworzonymi na drodze fuzji cholinergicznym neuronów przegrody mózgu 21-dniowej myszy z niecholinergicznymi komórkami neuroblastoma N18TG2 (Hammond i wsp. 1990). W warunkach hodowli były one dodatkowo pobudzane do różnicowania w kierunku fenotypu o cechach bardziej zbliżonych do prawidłowych neuronów cholinergicznym przegrody mózgu. W tym celu dodawano do środowiska wzrostowego komórek cAMP i kwas retinowy (Blusztajn i wsp. 1992, Jankowska i wsp. 2000). W efekcie dochodziło do formowania wypustek neuronalnych i połączeń synaptycznych, a także do wzrostu wielkości zarówno jądra komórkowego jak i samej komórki (Szutowicz i wsp. 2006). Charakterystyczne było również spowolnienie tempa podziałów spowodowane kwasem retinowym. Jednocześnie zwiększała się aktywność acetylotransferazy cholinowej (ChAT), a w konsekwencji wzrastał wewnątrzkomórkowy poziom oraz wydzielania acetylocholin (ACh) (Pedersen i wsp. 1995, Szutowicz i wsp. 2000). Wzrost ekspresji powierzchniowego receptora neurotrofin p75NTR pod wpływem cAMP/RA świadczy o różnicowaniu komórek SN56 w kierunku fenotypu charakterystycznego dla cholinergicznym neuronów przegrody mózgu (Szutowicz i wsp. 2006). Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że wysoka ekspresja fenotypu cholinergicznego powodowała obniżenie poziomu acetylo-CoA w mitochondriach, z uwagi na wzrost jego wpływu do cytoplazmy w celu zapewnienia zwiększonej syntezy acetylocholin (Bielarczyk i wsp. 2003). Powodowało to większą wrażliwość komórek cholinergicznym na czynniki cytotoksyczne (Szutowicz i wsp. 2006, Bizon-Zygmańska i wsp. 2011, Ronowska i wsp. 2010).

Wszelkie zaburzenia w produkcji i wewnątrzkomórkowej dystrybucji acetylo-CoA mogą więc odgrywać ważną rolę w patomechanizmach encefalopatii

cholinergicznym, a więc i choroby Alzheimera (Gibson i wsp. 1982, Szutowicz i wsp. 1982, 1998). Badania "in vitro" zarówno na komórkach neuroblastoma jak i frakcji zakończeń nerwowych mózgu wykazały, że dostępność acetylo-CoA do syntezy acetylocholin ma kluczowy wpływ na właściwe funkcjonowanie neuronów cholinergicznym (Jankowska-Kulawy i wsp.2010, Bizon-Zygmańska i wsp.2011). Jego niedobory wywołują z kolei powstawanie zaburzeń w metabolizmie energetycznym neuronów cholinergicznym i ich większą podatność na uszkodzenia przez czynniki neurotoksyczne. (Szutowicz i wsp. 1998, Szutowicz i wsp. 2006). Znanych jest wiele czynników negatywnie wpływających na metabolizm energetyczny neuronów cholinergicznym (np. Zn, amyloid- β , NO, A β). Nie wiadomo jednak czy negatywny wpływ LPS polega jedynie na pobudzaniu mikrogleju do wydzielania czynników neurotoksycznych, czy też on sam również wpływa toksycznie na te neurony uszkadzając ich metabolizm energetyczny.

W porównaniu do dojrzałych pierwotnych neuronów, neuroblastoma SN56 mają nieco niższą aktywność metabolizmu tlenowego jak również ekspresję fenotypu cholinergicznym. Stanowią jednak jednorodną populację neuronalnych komórek cholinergicznym. Dzięki temu wszystkie zmiany metabolizmu acetylo-CoA zachodzące pod wpływem czynników cytotoxycznych mogą być odnoszone w 100% do cholinergicznym przedziału komórkowego. Taka sytuacja jest niemożliwa do osiągnięcia w całym mózgu, gdzie w najlepszym przypadku jakim są izolowane zakończenia nerwowe kory mózgu, zawartość komponenty cholinergicznym wynosi około 10 % (Richardson i wsp. 1981).

Również problemy związane z zaburzeniami metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA w komórkach mikroglejowych w chorobach neurodegeneracyjnych, nie były jak dotąd przedmiotem badań. Nasze badania na komórkach neuronalnych SN56 wskazują, że środowisko cytotoxyczne w istotnym stopniu zaburzało ich metabolizm reszty acetylowej, a co za tym idzie i produkcję energii (Szutowicz i wsp.2000, Bielarczyk i wsp. 2003). Można przypuszczać, że te same czynniki cytotoxyczne będą wpływały również na mikroglej znajdujący się w sąsiedztwie uszkodzonych neuronów. Nie wiadomo jednak nic na temat ewentualnych zmian metabolizmu acetylo-CoA w mikrogleju w odpowiedzi na te sygnały neurotoksyczne.

Również badania metabolizmu energetycznego i enzymów z nim związanych w całym mózgu nie dały i nie mogą dać informacji dotyczących jego zmian w

poszczególnych przedziałach komórek glejowych i neuronów mózgu. Dlatego też podjęto badania metabolizmu reszty acetylowej w mikrogleju jak również szerzej zakrojonych prac zmierzających do poznania indywidualnych cech metabolizmu energetycznego w poszczególnych grupach komórek OUN.

Uzasadnia to podjęcie badań nad zależnościami między funkcją i metabolizmem acetylo-CoA w komórkach mikroglejowych w warunkach fizjologicznych i neurotoksycznych. Tego typu tematyka nie była podejmowana w literaturze światowej.

3. CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie współzależności między fenotypem komórek mikroglejowych, a ich funkcją i metabolizmem energetycznym w stanie spoczynkowym i po aktywacji przez patogeny środowiskowe.

W tym celu:

1. Zbadano parametry enzymologiczne i metaboliczne różnych fenotypów mikrogleju N9 oraz ich związek z jego funkcją i metabolizmem energetycznym.
2. Porównano metabolizm energetyczny mikrogleju z metabolizmem cholinergicznym komórek neuronalnych.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Odczynniki

Odczynniki pochodzące z Sigma-Aldrich., Poznań, Polska: acetylo-CoA, acetylo-fosforan, acetonitryl, acetylocholinesteraza, albumina wołowa, amfoterycyna B, ATP, błękit trypanu, β -amyloid, cis-akonitan, cytrynian sodu, dehydrogenaza jabłczanowa, dehydrogenaza izocytrynianowa, digitonina, ditiotretitol (DTT), środowisko Eagle zmodyfikowane według Dulbecco (DMEM), dimetylosulfotlenek (DMSO), DL-izocytrynian, dwumaślan cyklicznego AMP, ezeryna, fosfotransacetylaza, glukoza, L-glutamina, glicyna, HEPES, immunoglobulina ludzka, koenzym A (CoA), α -ketoglutaran sodu, kwas 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DNTB), liaza cytrynianowa z *Bacillus subtilis*, lipopolisacharyd z *Escherichia coli*, lucyferyna, lucyferaza, środowisko MEM, MOPS, NAD, NADH, NADP, NADPH, nadtlenek wodoru, odczynnik Griessa, pirofosforan tiaminy, pirogronian, roztwór penicyliny i streptomycyny, syntaza cytrynianowa, szczawiooctan, TRIS, Tricina, toluen.

Odczynniki pochodzące z Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria: Arsenazo III, bezwodnik kwasu maleinowego, kwas trójchlorooctowy merkaptoetanol, peroksydaza z korzenia chrzanu.

Odczynniki pochodzące z POCH (Gliwice, Polska): chloroform, etanol, metanol, kwas mrówkowy, kwas nadchlorowy, kwas solny, chlorek potasu, chlorek sodu, wodorowęglan potasu, węglan potasu, wersenian sodowy, wodorotlenek potasowy, wodorotlenek sodowy.

Odczynniki pochodzące z firmy Gibco : surowica płodowa cielęca (FBS).

Odczynniki pochodzące z firmy Bio-Rad (Warszawa, Polska) : Coomasie blue R250

Odczynniki pochodzące z firmy Perkin Elmer (Boston, USA): [1-¹⁴C] acetylo-CoA

4.2. Materiały zużywalne

Jednorazowe naczynia plastikowe używane do hodowli komórek pochodziły z firmy Medlab (Raszyn, Polska) oraz Sarstedt (Stare Babice, Polska)

4.3. Komórki mikroglejowe

Do doświadczeń używano linii mysich komórek mikroglejowych N9. Hodowla ta powstała poprzez wyizolowanie komórek mikroglejowych z mózgow

13-dniowych zarodków i unieśmiertelnienie ich na drodze transfekcji retrowirusem 3RV niosącym aktywny onkogen v-myc (Righi i wsp. 1989). Komórki N9 podarowane zostały przez prof. Janusza B. Suszkiwa (University of Cincinnati, OH, USA).

Hodowlę prowadzono w środowisku hodowlanym MEM zawierającym 10% surowicę płodową cielęcą (FBS), 2 mM L-glutaminę z dodatkiem 50 J.M/ml penicyliny, 50 µg/mL streptomycyny oraz 0.25 µg/mL amfoterycyny B, a także przy stężeniu glukozy 3.5 g/L.

Komórki po rozmrożeniu hodowano przez 7 dni w celu namnożenia w temperaturze 37°C, w atmosferze 95% powietrza i 5% CO₂. Komórki znajdowały się w środowisku hodowlanym MEM, które zmieniano co 2-3 dni. Doświadczenia przeprowadzono na pasażach od 9 do 39.

Każde doświadczenie składało się z dwóch etapów. W etapie pierwszym komórki N9 hodowano w płaskich butelkach (Sarstedt, Stare Babice, Polska) o powierzchni 75 cm² przy gęstości 40000/cm² do stanu subkonfluencji co odpowiadało zajęciu przez komórki około 80% powierzchni butelki hodowlanej. Stan subkonfluencji otrzymywano po 48 godzinach hodowli. W części doświadczeń, w etapie pierwszym dodawano do środowisk hodowlanych na 48 godzin : 0.25 mM dwumaślan-cAMP i 1 µM kwas retinowy. W etapie drugim tzn. po 48 godzinach hodowli wymieniano środowisko wzrostowe na środowisko doświadczalne z dodatkiem lub bez lipopolisacharydu w stężeniach od 0.005 µg/mL do 10.0 µg/mL; hodowlę kontynuowano przez kolejne 24 godziny. Hodowlę kończono usuwając doświadczalne środowisko hodowlane. Komórki znajdujące się w butelce hodowlanej przepłukiwano ostrożnie 5 ml buforu „Pucks” który zawierał : 5.36 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.4 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 5 mM glukozę, pH środowiska 7.4. Następnie przy użyciu plastikowych skrobaczek i kolejnych 5 ml buforu Pucks zbierano komórki przytwierdzone do dna butelki hodowlanej. Tak zebraną zawiesinę komórek wirowano z szybkością 1200 obr./min (208x g) przez okres 7 minut. Nadsącz odrzucano, a osad zawierający komórki zawieszano w 0.32M sacharozie zbuforowanej 5 mM buforem HEPES pH 7.4 oraz 0.1 mM EDTA-Ca.

4.4. Komórki cholinergiczne.

W doświadczeniach używano linii komórek cholinergicznych SN56.B5.G4, która powstała na drodze fuzji niecholinergicznych mysich komórek neuroblastoma N18TG2 z cholinergicznymi neuronami pochodzącymi z przegrody mózgu 21-dniowej myszy (Hammond i wsp. 1990). Komórki te podarowane zostały przez prof. Jana K. Blusztajna (Boston University, Boston, MS, USA).

Po rozmrożeniu komórki namnażano w pożywce Eagle zmodyfikowanej według Dulbecco (DMEM) zawierającej 10% surowicy płodowej cielęcej (FBS) oraz 2 mM L-glutaminę, z dodatkiem 50 µg/mL streptomycyny, 50 J.M/mL penicyliny, 0.25 µg/mL amfoterycyny B. Temperatura i atmosfera w inkubatorze były jak w przypadku komórek N9 (punkt 4.3.).

Przez pierwsze 48 godzin doświadczenia komórki SN56 hodowano w pożywce MEM używając płaskich butelek o powierzchni 75 cm² i gęstości odpowiadającej 40000 komórek na cm². Część próbek hodowano w tym czasie z dodatkiem 1 mM dwumaślanu-cAMP i 1 µM kwasu retinowego. Zastosowanie tych czynników różnicujących zwiększało ekspresję fenotypu cholinergicznego. Po 48 godzinach hodowli i osiągnięciu stanu subkonfluencji, wymieniano pożywkę na nową, dodając do części próbek na kolejne 24 godziny lipopolisacharyd. Hodowlę kończono postępując jak w punkcie 4.3.

4.5. Zamrażanie komórek

Komórki przechowywano w temperaturze - 80°C. Pożywka zamrażająca dla komórek N9 oraz SN56 zawierała w 63% pożywkę DMEM, 30% FBS, oraz 7% dimetylosulfo tlenek (DMSO). Próbki komórek o objętości 0.5 mL zamrażano w krioampułkach przy gęstości zawiesiny komórek 2–2.5 mln/mL pożywki.

4.6. Badane czynniki

4.6.1. Lipopolisacharyd

W doświadczeniach używano lipopolisacharydu (LPS) z *Escherichia coli* serotyp 026:B6 (Sigma, Poznań). Sporządzano roztwór wyjściowy o stężeniu 1 mg/mL, który dalej rozcieńczano do 1 lub 10 µg/mL, a następnie dodawano do pożywki wzrostowej tak, aby uzyskać końcowe stężenie od 0.005 do 10.0 µg/mL. LPS dodawano do pożywki na ostatnie 24 godziny hodowli.

4.6.2. Kwas retinowy.

Wyjściowy roztwór kwasu retinowego (RA) o stężeniu 10 mM rozcieńczano 100-krotnie przy użyciu 0.9% NaCl. Tak sporządzony roztwór 100 μ M RA dodawano do pożywki wzrostowej w objętości 10 μ L na każdy mililitr pożywki wzrostowej MEM. Końcowe stężenie RA wynosiło wówczas 0.001 mM.

4.6.3. Dwumaślan-cAMP

Dodawano 2.5 mg dwumaślanu cyklicznego AMP na 20 ml pożywki wzrostowej, tak aby jego stężenie końcowe wynosiło 0.25 mM.

4.7. Ocena przeżywalności komórek (Butler,1989)

Stopień przeżywalności komórek określano przy użyciu błękitu trypanu. Komórki zawieszono w 0.32 M sacharozie rozcieńczano 5-krotnie sacharozą, a następnie 2-krotnie 0.4% izotonicznym roztworem błękitu trypanu. Tak rozcieńczoną zawiesinę komórek umieszczano niezwłocznie w komorze hematologicznej Fuchs-Rosental. Oceny dokonywano przy 200-krotnym powiększeniu w mikroskopie świetlnym. Całkowita liczba komórek oraz frakcja komórek uszkodzonych (zatrzymujących błękit trypanu) określana była w ciągu 2 minut od dodania barwnika do zawiesiny komórek.

4.8. Oznaczanie aktywności enzymów

Pomiar aktywności enzymów takich jak: akonitaza, dehydrogenaza izocytrynianowa, dehydrogenaza α -ketoglutaranowa, oraz liaza ATP-cytrynianowa wykonywany był niezwłocznie po zebraniu komórek. Próby znajdowały się cały czas w temperaturze 4°C. Do oznaczenia dehydrogenazy pirogronianowej 0.05 mL zawiesinę komórek w sacharozie zamrażano w -20°C na okres nie dłuższy niż 2 tygodnie. Przed oznaczeniem aktywności każdego z enzymów próbki komórek rozcieńczane były Tritonem X-100 w objętości niezbędnej do uzyskania odpowiedniego stężenia białka. Końcowe stężenie Tritonu X-100 w próbce wynosiło 0.2%.

4.8.1. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC, EC 1.2.4.1) (Szutowicz i wsp. 1981).

Aktywność PDHC oznaczano poprzez pomiar powstającego acetylowanego koenzymu A (acetylo-CoA), który przeprowadzano do cytrynianu przy użyciu syntazy cytrynianowej. Środowisko inkubacyjne w końcowej objętości 0.25 mL zawierało: 50 mM bufor Tris/HCl pH 8.3, 2 mM MgCl₂, 10 mM dithiotreitol, 2 mM NAD, 10 mM pirogronian, 2 mM pirofosforan tiaminy, 0.20 mM CoA, 2.5 mM szczawiooctan, 0.15 J.M. syntazy cytrynianowej. Próby ślepe nie zawierały koenzymu A (CoA). Reakcję rozpoczynano dodaniem próby zawierającej 0.10 mg białka. Inkubację prowadzono w łaźni wodnej w warunkach 37°C przez 30 minut. Po tym czasie reakcję przerywano umieszczając próbkę na 10 minut w temperaturze 99°C. Powodowało to rozkład nie zużytego szczawiooctanu. W kolejnym etapie próby wirowano przy 10.000 obrotów przez 60 sekund, a następnie oznaczano w nich zawartość powstałego cytrynianu przy użyciu liazy bakteryjnej sprzężonej z dehydrogenazą jabłczanową i NADH. Aktywność PDH wyrażano w nmolach utlenionego NADH/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbcyjności molowej dla NADH 6.22/mol/cm.

Środowisko do oznaczania cytrynianu w 0.7 mL końcowej objętości zawierało: 100 mM bufor Tris/HCl o pH 7.4, 0.1 mM NADH, 0.2 J.M. dehydrogenazy jabłczanowej i 0.2 ml próby. Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.1 J.M. bakteryjnej liazy cytrynianowej [EC 3.1.2.16]. Mierzono spadek absorbcyjności przy $\lambda=340$ nm. Liazę cytrynianową rozpuszczano w środowisku składającym się z : 10 mM HN₄SO₄ i 20 mM ZnSO₄, 50 mM bufor Tris/HCl .

4.8.2. Akonitaza (EC 4.2.1.3) (De Villafranca i Haines 1974)

Oznaczenie aktywności akonitazy polegało na pomiarze wzrostu absorbcyjności, do którego dochodziło na skutek redukcji NADP do NADPH podczas reakcji utleniania izocytrynianu powstającego z akonitanu.

Środowisko inkubacyjne w końcowej objętości 0.8 ml zawierało: 50 mM bufor Tris/HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl₂, 0.1 mM NADP, 1 J.M. dehydrogenazy izocytrynianowej a także 0.1 mL badanej próbki o zawartości białka 0.1 mg. Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.01 ml 20 mM cis-akonitanu, a następnie mierzono przyrost absorbcyjności przez okres 10 minut przy $\lambda=340$ nm. Pomiaru dokonywano w temperaturze 37°C ,w termostatowanym spektrofotometrze Ultrospec

firmy Unicam. Aktywność obliczano w nmolach zredukowanego NADP/min/mg białka wykorzystując współczynnik absorbancji molowej dla NADPH 6.22/mol/cm.

4.8.3. Kompleks dehydrogenazy α -ketoglutaranowej (KGDHC, EC 1.2.4.4) (Pawelczyk i Angielski 1984).

Aktywność enzymu oznaczano mierząc wzrost absorbancji wynikającej z redukcji NAD do NADH, do której dochodziło podczas dekarboksylacji oksydacyjnej α -ketoglutaranu do bursztynylo-CoA.

Środowisko inkubacyjne do oznaczania aktywności enzymu zawierało w 0.7 mL końcowej objętości : 75 mM HEPESNa o pH 7.4, 1.0 mM NAD, 1.0 mM ditiotreititol (DTT), 0.5 mM pirofosforan tiaminy, 1.0 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5 mM 2-oksoglutaran oraz 0.1 mL badanej próbki o zawartości białka 1.0 mg (komórki N9) lub 0.4 mg (komórki SN56). Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.01 mL 10 mM CoA, a następnie mierzono przyrost absorbancji przez okres 10 minut przy $\lambda=340$ nm. Pomiaru dokonywano w temperaturze 37°C, w termostatowanym spektrofotometrze Ultrospec firmy Unicam. Aktywność obliczano w nmolach zredukowanego NAD/min/mg białka przy współczynniku absorbancji molowej dla NADH 6.22/mol/cm.

4.8.4. Dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od NADP (IDH, EC 1.1.1.42) (Plaut 1968).

Środowisko inkubacyjne w końcowej objętości 0.5 ml zawierało: 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 0.5 mM NADP, 0.6 mM MgCl₂ oraz 0.1 mL badanej próbki o zawartości białka 0.1 mg. Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.01 mL 10 mM DL-izocytrynianu, a następnie mierzono przyrost absorbancji przez okres 10 minut przy $\lambda=340$ nm. Pomiaru dokonywano w temperaturze 37°C, w termostatowanym spektrofotometrze Ultrospec firmy Unicam. Aktywność obliczano w nmolach zredukowanego NADP/min/mg białka przy współczynniku absorbancji molowej dla NADPH 6.22/mol/cm.

4.8.5. Liaza ATP-cytrynianowa (ACL, EC 2.3.3.8) (Szutowicz i Angielski 1970)

Aktywność ACL mierzono poprzez pomiar ilości wytworzonego szczawiooctanu. Środowisko w końcowej objętości 0.7 mL zawierało: 100 mM bufor Tris/HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM cytrynian

trójpotasowy, 0.2 mM NADH oraz 1 J.M. dehydrogenazy jabłczanowej oraz 0,1 mL próbki odpowiadającej 0.4 mg białka.

Reakcję rozpoczynano dodaniem 25 μ L 100 mM ATP, a następnie mierzono spadek absorbancji przez okres 10 minut przy $\lambda=340$ nm. Pomiaru dokonywano w temperaturze 37°C, w termostatowanym spektrofotometrze Ultrospec firmy Unicam. Aktywność obliczano w nmolach utlenionego NADH/min/mg białka przy współczynnika absorbancji molowej $\lambda=340$ nm dla NADH 6.22/mol/cm.

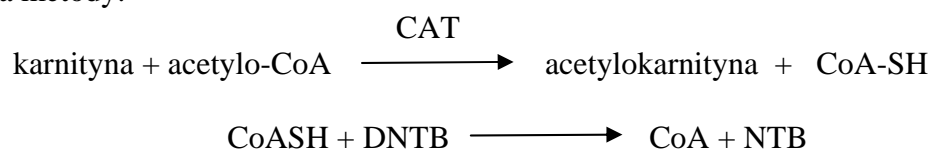
4.8.6. Syntaza cytrynianowa (CS, EC 2.3.3.1) (Wright i wsp. 1967)

Syntaza cytrynianowa katalizuje kondensację szczawiooctanu z acetylo-CoA z wytworzeniem cytrynianu. Powstający CoA-SH powoduje redukcję DNTB (amid kwasu 5,5'-dithiobis2-nitrobenzoesowego) do NTB (amidu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego).

Środowisko zawierało w końcowej objętości 0.7 mL : 100mM bufor Tris-HCl o pH 8.0 , 0.015 mM acetylo-CoA, 0.2 mM DNTB, 0.2 mM szczawiooctan, a także badaną próbkę o zawartości białka 0.05 mg. Po rozpoczęciu reakcji dodaniem szczawiooctanu mierzono wzrost absorbancji przy $\lambda=405$ nm. Aktywność enzymu obliczano korzystając ze współczynnika absorbancji dla NTB 19.15/mol/cm.

4.8.7. Acetylotransferaza karnitynowa (CAT, EC 2.3.2.21) (Edwards i wsp. 1974)

Zasada metody:



Aktywność CAT wylicza się z grup tiolowych-SH dających barwny produkt reakcji po redukcji kwasu 5,5-ditiobis-2-benzoesowego (DNTB).

Do prób zerowych nie dodawano karnityny.

Środowisko inkubacyjne zawierało w końcowej objętości 0.2 mL : 62mM bufor Tris-HCl o pH 7.6 , 30 mM DL karnityna. Do 0.2 mL środowiska inkubacyjnego dodawano 100 μ L próby badanej o zawartości białka 0.2 mg.

Reakcję rozpoczynano acetylo-CoA o końcowym stężeniu 10mM. Acetylo-CoA dodawano w równych odstępach czasu, co 15 sekund. Po 15 minutach inkubacji

przebiegającej w temperaturze 37°C, przerywano reakcję dodając TCA 40%. Następnie próby odwirowywano przez 4 minuty przy prędkości wirowania 10000 obrotów/min. Nadsącz zobojętniano 0.8M buforem Tris/50mM EDTA. Po dodaniu DNTB o końcowym stężeniu 2mM mierzono absorbancję przy $\lambda=405$ nm. Aktywność enzymu obliczano korzystając ze współczynnika absorbancji molowej dla DTNB 13.6/mol/cm, a wynik podawano w nmolach/min/mg białka.

4.8.8. Acetylotransferaza cholinowa (ChAT, EC 2.3.1.6) (Fonnum 1969)

Aktywność ChAT oznaczano używając [1-¹⁴C] acetylo-CoA. Środowisko inkubacyjne zawierało w końcowej objętości 0.01mL: 50mM bufor fosforanowo-sodowy o pH 7.4, 600 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05% albuminę wołową, 0.24mM-[1-¹⁴C] acetylo-CoA (0.025 mCi na próbę, 92.000 impulsów/próbę), 0.20mM siarczan eseryny oraz 0.05mM chlorek choliny. Do wąskich probówek Eppendorfa o objętości 0.50 mL dodawano 0.005 mL próby zawierającej od 0.05 do 0.10 mg białka przy użyciu pipety Hamilton, a następnie roztwór solubilizacyjny zawierający 0.2% Tryton X-100 oraz 50mM bufor fosforanowo-sodowy. Następnie próby inkubowano w temperaturze 4°C przez okres 15 minut. Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.01 mM środowiska inkubacyjnego do homogenatu komórek. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C i po tym czasie przerywano poprzez odcięcie końca próbki do 4 mL zimnego 10 mM buforu fosforanowo-sodowego pH 7,4 z 2.0 mL roztworu acetonitrylu z 0.5 % czterofenylu boronem sodowym w naczyniu scyntylacyjnym. Mieszaninę wstrząsano przy użyciu mieszadła typu Vortex. Następnie do naczynek scyntylacyjnych dodawano 10 mL scyntylatora toluenowego.

Próby zerowe zamiast białka zawierały 50 mM bufor fosforanowo-sodowy. Mierzono ilość powstałej acetylocholinyl znakowanej [¹⁴C] (kompleks z czterofenylu boronem) rozpuszczonej w fazie organicznej. Całkowitą radioaktywność środowiska mierzono po jego rozpuszczeniu w scyntylatorze dioksanowym. Aktywność ChAT wyliczano na podstawie ilości węgla [¹⁴C], który wbudował się do acetylocholinyl po odjęciu prób zerowych w odniesieniu do całkowitej radioaktywności środowiska reakcyjnego. Aktywność wyrażano w nmolach zsyntetyzowanej acetylocholinyl/min/mg białka.

4.9.Badanie parametrów metabolizmu komórek

4.9.1.Oznaczenie poziomu całkowitego Acetylo-CoA (Szutowicz i Bielarczyk 1987)

Peletę komórek zawieszano w środowisku inkubacyjnym o temperaturze 0-4°C zawierającym pirogronian, tak aby stężenie białka wynosiło ok. 2-3 mg/mL. Z tak przygotowanej zawiesiny komórek pobierano 0.4 mL, a następnie wirowano przez 3 minuty w 4°C przy prędkości 12.000 obrotów/minutę. Nasącz odrzucano, a osad odbiałczano przez zawieszenie w 0.3 mL 5mM HCl i inkubację w temp. 100°C przez 2 minuty. Tak przygotowane próbki zamrażano w temperaturze -20°C. Całkowity poziom acetylo-CoA oznaczano w ciągu 14 dni od dnia zamrożenia. Po rozmrożeniu próbek, wirowano je przez 1 minutę przy prędkości 10000 x g. Nadsącz doprowadzano do pH 7.4 używając w tym celu 50 mM roztworu Tris. Acetylo-CoA oznaczano zmodyfikowaną metodą cyklizacyjną z fosfotransacetylazą i syntazą cytrynianową (Szutowicz i Bielarczyk, 1987). Metoda ta umożliwia kilkutyśięcną amplifikację acetylo-CoA w próbce badanej i pomiar kilkunastonastomolowych ilości cytrynianu jako końcowego produktu reakcji.

Przed cyklizacją usuwano z próbek wolny CoA-SH przez nieodwracalne związanie go z bezwodnikiem kwasu maleinowego. Do 0.04 mL próbki dodawano 0.01 mL buforu Tris/HCl (pH 7.4) oraz 0.01 mL świeżo sporządzonego 1 mM roztworu bezwodnika maleinowego w eterze etylowym. Następnie próbki wytrząsano w wytrząsarce Eppendorf typ 3300 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 120 min w celu usunięcia eteru (Szutowicz i Bielarczyk 1987). Równolegle z próbkami wykonywano krzywą standardową zawierającą od 0 do 10 pmoli acetylo-CoA.

Środowisko cyklizacyjne które przygotowuywano bezpośrednio przez użyciem zawierało w końcowej objętości 0.1 mL : 50 mM bufor Tris/HCl o pH 7.4, 5 mM NH₄Cl, 0.01% (w/v) albuminę wołową, 1 mM acetylofosforan, 1.2 mM szczawiooctan, 1 J.M. syntazy cytrynianowej oraz 1 J.M. fosfotransacetylazy. Przed reakcją cyklizacji odparowywano resztki eteru otwierając próbki z próbkami. Reakcję cyklizacji rozpoczynano dodaniem 0.05 mL mieszaniny cyklizacyjnej do 0.05 ml próbki. Cyklizację prowadzono w łaźni wodnej, w 30°C przez 100 minut. Po tym czasie proces przerywano umieszczając próbki w bloku termicznym 100°C

na 10 minut. W kolejnym etapie próbki odwirowywano i w nadsączu oznaczano ilość powstałego cytrynianu (punkt 4.8.1.).

4.9.2.Oznaczenie poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA (Szutowicz i Bielarczyk 1987).

Ze środowiska rozcieńczonych komórek do 2-3 mg białka/mL pobierano 0.4 mL i mieszało w probówce typu Eppendorg z 0.4 mL zimnego roztworu lizującego zawierającego : 20 mM HEPES (pH 7.4), 125 mM KCl, 3 mM EDTA-Na oraz 0.005 mg digitoniny i inkubowano przez 90 sekund. Pobierano 0.7 mL i наносono na mieszaninę olejów silikonowych o gęstości 1.39 g/cm³ (AR-20 i AR-200 w stosunku 1:2) a następnie wirowano przez 60 sekund przy prędkości wirowania 10.000 x g. W kolejnym etapie przenoszono 0.4 mL nadsączu będącego frakcją cytosolową do oddzielnych probówek. Oleje usuwano, a osad zawierający mitochondria osuszano i odbiałczano przez dodanie 0.2 mL 5 mM HCl i inkubację przez 2 minuty w temperaturze 100°C. Próbkę zamrażano w -20°C na okres nie dłuższy niż 14 dni. Poziom acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej oznaczano analogicznie jak w całych komórkach.

4.9.3.Obliczanie poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA

Zawartość cytoplazmatycznego acetylo-CoA obliczano odejmując zawartość acetylo-CoA w mitochondriach od jego zawartości w całych komórkach.

4.9.4.Oznaczenie całkowitego poziomu ATP w komórkach (Gorman i wsp. 2003).

Komórki hodowano przez 3 doby na płytkach 3 centymetrowych. Po tym czasie pożywkę usuwano, a płytkę delikatnie przemywano buforem Pucks w celu usunięcia resztek pożywki. Płytki umieszczano na lodzie, zalewano 1 mL zimnego 4% HClO₄, zbierano zeszkrobaniem komórki i wirowano przez 3 minuty przy 10 000 x g w temperaturze 4°C. Osad rozpuszczano w 1 M NaOH w celu określenia stężenia białka. Nadsącz zamrażano w -20°C na okres nie dłuższy niż 14 dni. W dniu oznaczenia ATP nadsącz rozmrażano, pobierano z niego 0.1 mL, które następnie zobojętniano do pH 7.0 przy użyciu 7.5 N K₂CO₃.

ATP oznaczano w obecności lucyferazy i jej substratu lucyferyny. Pod wpływem lucyferazy dochodzi do adenylacji lucyferyny przez ATP. W procesie

spontanicznego utleniania adenylolucyferyny generowany jest kwant światła, który mierzony był lumenometrycznie na luminometrze Junior (Berthold Technology, Bad Wild-bad, Niemcy).

4.10. Wydzielanie tlenku azotu (NO) (Miranda i wsp. 2001)

Wydzielanie tlenku azotu przez komórki mierzono metodą pośrednią poprzez oznaczenie stężenia azotynów (NO_2^-)- stabilnego produktu utleniania NO. Zastosowano metodą spektrofotometryczną opartą o reakcję Griessa-Ilosvaya polegającą na diazowaniu pierwszorzędowych amin aromatycznych oraz sprzęganiu powstałych soli diazoniowych, z otrzymaniem fioletowego barwnika azowego.

Pomiaru NO_2^- dokonywano w pożywce hodowlanej pochodzącej z ostatnich 24 godzin hodowli. Próbę ślepą stanowiła woda. Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej używano azotanu sodu (NaNO_2) w stężeniach od 1 do 50 $\mu\text{M/L}$. Do 200 μL próby (pożywka lub woda lub wzorzec) dodawano 250 μL wody oraz 450 μL odczynnika Griessa (Sigma, Poznań). Pomiaru absorbancji dokonywano po 15 minutach inkubacji w temp. pokojowej przy długości fali 540nm. Wyniki podawano w nmolach NO_2^- wydzielonego do pożywki na mg białka komórkowego.

4.11. Ocena wskaźników reakcji zapalnej

4.11.1. Oznaczanie stężenia interleukiny 6 (IL-6)

Pomiaru stężenia Il-6 dokonywano w pożywce wzrostowej pochodzącej z ostatnich 24 godzin hodowli. Wykorzystano w tym celu metodę immunoenzymatyczną ELISA opartą o mysie przeciwciała przeciw IL-6 oraz układ biotyna-streptawidyna (LOT 57267028, Biomedica, Piaseczno). Całość reakcji przeprowadzano na mikropłytkach. Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej używano mysiej interleukiny 6 w stężeniach od 31.3 do 2000 pg/mL. Barwny produkt reakcji mierzono na analizatorze płytkowym ETI-MAX 3000 (STRATEC Biomedical Systems AG) przy długości fali $\lambda=450$ nm. Wynik wyrażano w pg Il-6 / mg białka komórkowego.

4.11.2. Oznaczanie stężenia czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α)

Pomiaru stężenia TNF- α dokonywano w pożywce wzrostowej pochodzącej z ostatnich 24 godzin hodowli. Wykorzystano w tym celu metodę immunoenzymatyczną ELISA opartą o poliklonalne mysie przeciwciała przeciw

TNF- α (LOT 275518, Biomedica, Piaseczno). Całość reakcji przeprowadzano na mikropłytkach. Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej używano mysiego TNF- α w stężeniach od 23.4 do 1500 pg/mL. Barwny produkt reakcji mierzono na analizatorze płytkowym ETI-MAX 3000 (STRATEC Biomedical Systems AG) przy długości fali $\lambda=450$ nm. Wynik wyrażano w pg TNF- α / mg białka komórkowego.

4.12.Oznaczenie stężenia białka (Bradford, 1976)

Białko oznaczano metodą Bradforda. Do krzywej kalibracyjnej używano immunoglobuliny ludzkiej w stężeniach od 0.20 do 0.80 mg/mL. Do 0.05 mL badanej próby lub wzorca dodawano 4.5 mL roztworu błękitu brylantowego G-250. Absorbancję odczytywano po 10 minutach na spektrofotometrze Shimadzu UV 1202 (Shimadzu Europa, Duisburg, Germany) przy $\lambda=578$ nm.

4.13.Metody statystyczne

Wyniki przedstawiano w postaci wartości średnich \pm standardowy błąd średniej (SEM). Do określenia różnic między kilkoma grupami zastosowano test ANOVA z testem *post hoc* Bonfferoni. Dla porównania dwóch grup wyników używano niesparowanego testu t-Studenta. Za minimalny wskaźnik różnicy statystycznie znamiennej między wynikami przyjęto $p<0.05$. Zależność pomiędzy różnymi parametrami określano za pomocą współczynnika korelacji liniowej z użyciem testu Pearsona. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonywano przy użyciu programu Graph Pad Prism 4 Graph (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

5. WYNIKI

5.1. Parametry wzrostowe i metaboliczne komórek mikroglejowych N9 i neuronalnych SN56

Fenotypy poszczególnych rodzajów komórek mózgowych różnią się licznymi parametrami morfologicznymi, metabolicznymi i czynnościowymi. W związku z tym stężenie wielu metabolitów oraz białek w astrocytach, oligodendrocytach, mikrogleju i różnych komórkach neuronalnych są bardzo zróżnicowane. Szczególnie niewiele danych dotyczy parametrów metabolizmu energetycznego. Dlatego w przedstawionej pracy porównano cechy metabolizmu energetycznego mikroglejowych komórek N9 z analogicznymi parametrami komórek cholinergicznymi SN56. W tym celu zmierzono wyjściowy poziom wybranych enzymów metabolizmu energetycznego oraz poziom i dystrybucję acetylo-CoA, a także poziom ATP w komórkach N9 (Tabela 1).

Komórki mikroglejowe N9 w warunkach podstawowych, w porównaniu do neuronów cholinergicznymi SN56, charakteryzowały się niższymi odpowiednio o blisko 32 % i 35 % aktywnościami PDHC i akonitazy (Tabela1). Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej była o 50 % wyższa w komórkach mikroglejowych N9. Komórki mikroglejowe posiadały niższą o blisko 75 % aktywność KGDHC (Tabela1). Aktywność liazy ATP-cytrynianowej i acetylotransferazy karnitynowej w SN56 były odpowiednio 7 i 3 razy wyższe niż w komórkach N9. Z kolei całkowity poziom acetylo-CoA i ATP były w neuronach cholinergicznymi odpowiednio o 33% niższe i o 84% wyższe niż w komórkach mikroglejowych (Tab.1).

Tabela 1. Wyjściowy poziom wybranych enzymów i metabolitów metabolizmu energetycznego komórek mikroglejowych N9 i neuronów cholinergicznyc SN56.

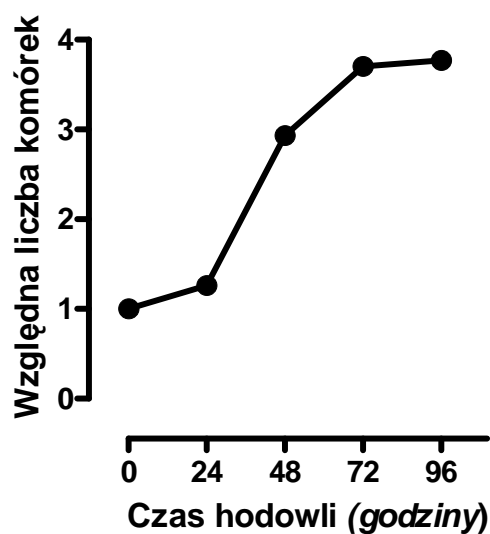
PARAMETR	Poziom w komórkach N9	Poziom w komórkach SN56
Dehydrogenaza pirogronianowa (<i>nmole/min/mg białka</i>)	5.7 ± 0.3	8.4 ± 2.0 *
Syntaza cytrynianowa (<i>nmole/min/mg białka</i>)	191.7 ± 3.8	-
Akonitaza (<i>nmole/min/mg białka</i>)	21.5 ± 1.5	33.3 ± 3.5 **
Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP-zależna (<i>nmole/min/mg białka</i>)	39.0 ± 2.2	19.6 ± 0.6 **
Dehydrogenaza α-ketoglutaranowa (<i>nmole/min/mg białka</i>)	2.1 ± 0.2	8.3 ± 0.2 **
Liaza ATP-cytrynianowa (<i>nmole/min/mg białka</i>)	5.6 ± 0.4	38.4 ± 1.4 **°
Acetylotransferaza karnitynowa (<i>nmole/min/mg białka</i>)	5.3 ± 0.3	14.7 ± 0.7 **°
Całkowity poziom Acetylo-CoA (<i>pmole/mg białka</i>)	42.5 ± 2.1	28.3 ± 0.9 *
Mitochondrialny Acetylo-CoA (% całkowitego poziomu)	19.1 ± 4.8	31.0 ± 2.5 *°
Cytoplazmatyczny Acetylo-CoA (% całkowitego poziomu)	80.9 ± 4.8	69.0 ± 2.5 *°
Całkowity poziom ATP (<i>nmole/mg białka</i>)	11.7 ± 0.8	21.5 ± 0.8 **°
Białko mitochondrialne (% białka całkowitego)	49.4 ± 1.7	51.8 ± 1.6 †

Wyniki są wartościami średnimi ±SEM z 3-22 doświadczeń. Znamienne różne od: mikrogleju, *p<0.05, **p<0.001

†Komórki hodowane w pożywce DMEM. Wg. Ronowska A. Praca doktorska 2008. oraz Szutowicz i wsp.1999. Wyniki są wartościami średnimi ±SEM z 3-12 doświadczeń.

°Komórki hodowane w pożywce MEM. Wg. Bizon-Zygmańska i wsp.2011

W warunkach hodowlanych szybkość podziałów komórkowych ulegała zahamowaniu między 48 a 72 godziną, co odpowiadało osiągnięciu przez nie stanu subkonfluencji (Ryc.3).

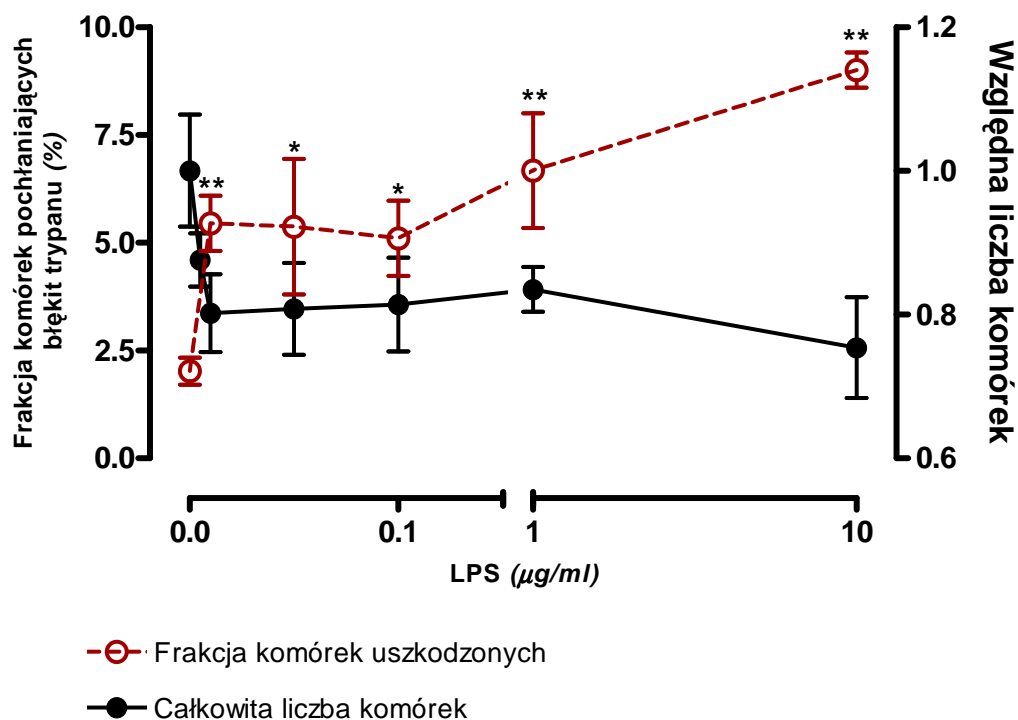


Ryc.3. Krzywa wzrostu komórek mikroglejowych N9 w warunkach kontrolnych
Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-12 doświadczeń.

5.2 Wpływ lipopolisacharydu na komórki mikroglejowe N9

5.2.1. Cytotoksyczność LPS.

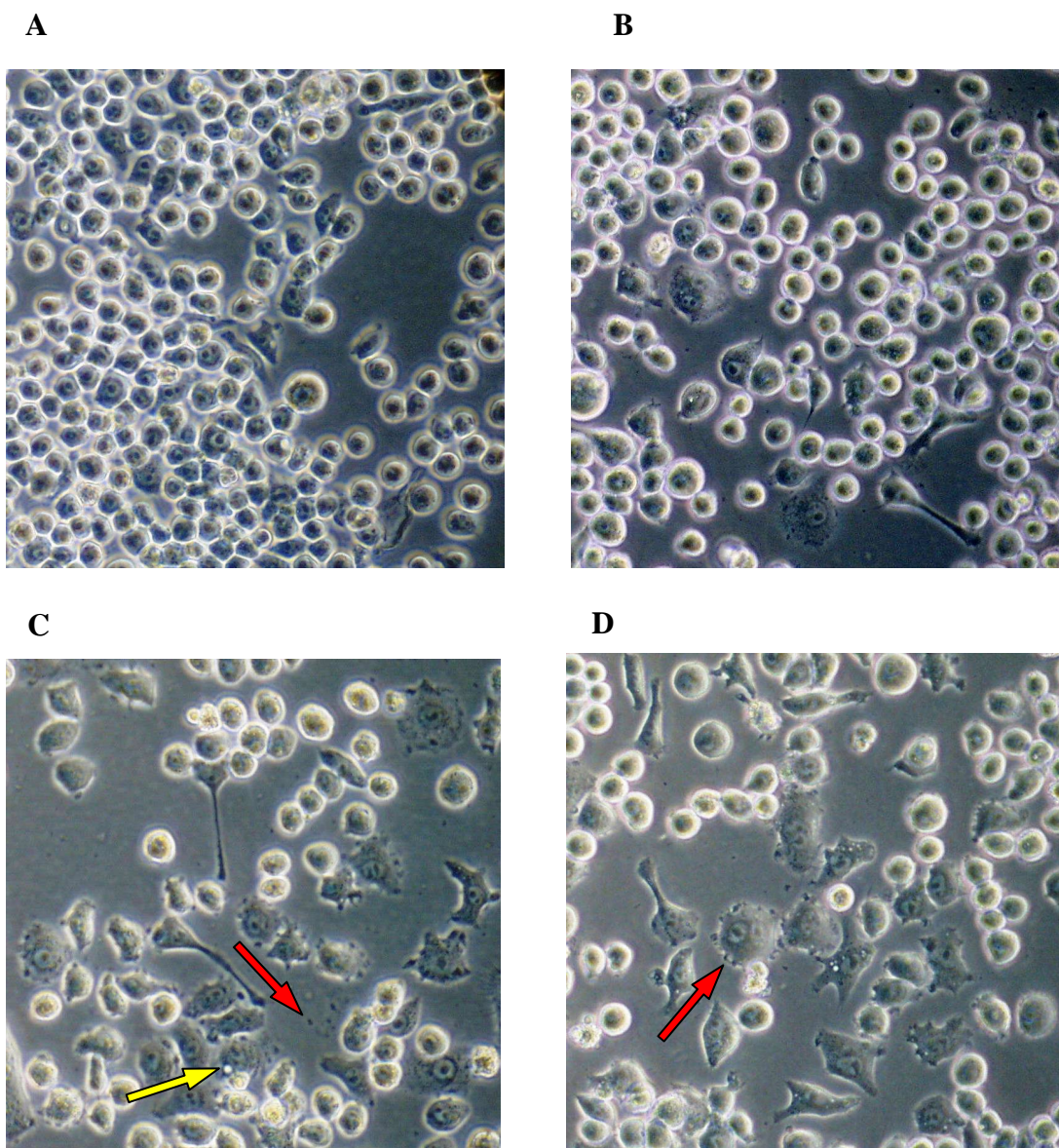
24-godzinna hodowla komórek N9 w środowisku zawierającym LPS w stężeniach od 0.005 do 10.0 μ g/mL nie powodowała istotnych statystycznie zmian w liczbie komórek. Zmianie ulegała natomiast frakcja komórek uszkodzonych. Wzrastała ona z 2 % w warunkach kontrolnych do 5.5 % przy stężeniu LPS 0.01 μ g/mL, dochodząc do 9.0% przy LPS 10.0 μ g/mL (Ryc.4.)





Ryc.4. Zależny od stężenia wpływ LPS na wzrost i stopień uszkodzenia komórek N9. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3-19 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, *p<0.05 , **p<0.001

5.2.2. Wpływ LPS na morfologię komórek N9.

LPS już w stężeniu 0.01 µg/mL powodował widoczne zmiany w morfologii komórek N9, które pogłębiały się wraz ze wzrostem jego stężenia.. Pod wpływem LPS komórki stawały się większe, przybierały kształt ameboidalny, wydłużony, czasem wielobiegunowy (Ryc.5C, D). Błona komórkowa ulegała zniekształceniu, a wewnątrz komórek pojawiały się wodniczki. Obecne były liczne ziarnistości, które obserwowano zarówno wewnątrz jak i poza komórkami (Ryc.5).



Legenda:  wodniczka;  ziarnistość

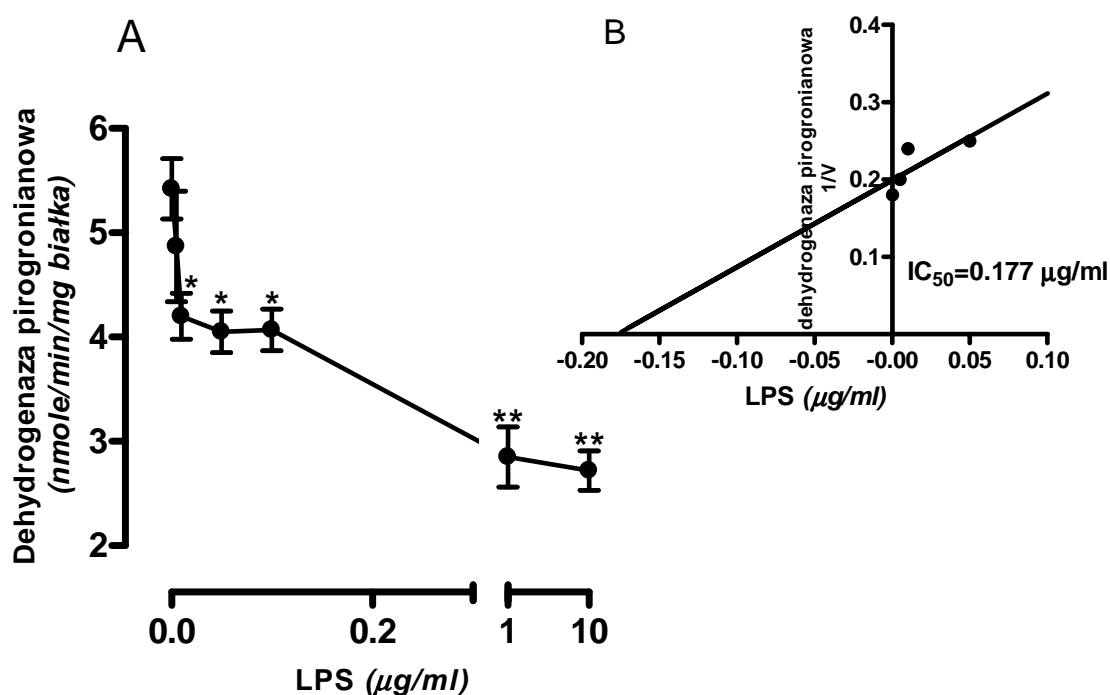
Ryc.5. Wpływ LPS na zmiany morfologiczne w komórkach N9 A) kontrola, B) LPS 0.01 $\mu\text{g/mL}$, C) LPS 1.0 $\mu\text{g/mL}$, D) LPS 10.0 $\mu\text{g/mL}$. Zdjęcia są reprezentatywne dla 5 doświadczeń.

5.2.3. Wpływ LPS na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego komórek N9.

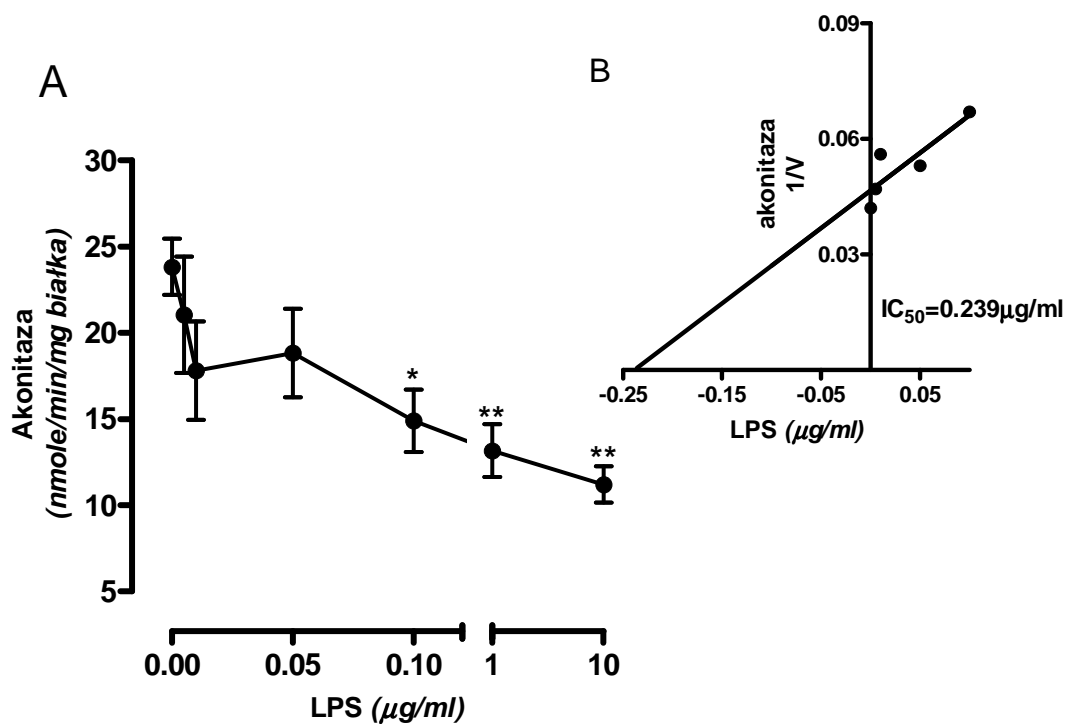
24-godzinna stymulacja mikrogleju LPS powodowała zależny od jego stężenia spadek aktywności PDHC (Ryc.6A). Stała inhibitorowa (IC_{50}) wyznaczona ze stężeń LPS 0.01-0.05 $\mu\text{g/mL}$ wynosiła 0.177 $\mu\text{g/mL}$ (Ryc.6B). LPS w stężeniu 1 $\mu\text{g/mL}$ obniżał aktywność PDHC z 5.4 do 2.8 nmola/min/mg białka. Dalsze

zwiększanie stężenia LPS do 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nie pogłębiało znacząco tej inhibicji. Również aktywność akonitazy ulegała obniżeniu wraz ze wzrostem stężenia LPS. Przy stężeniu LPS 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aktywność akonitazy spadała o 37.5 %, a przy LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spadek aktywności tego enzymu sięgał 53 % (Ryc.7A). IC_{50} wyliczone ze stężeń LPS 0.005-0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ w tym przypadku równe było 0.239 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ryc.7B). LPS do stężenia 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nie powodował zmian aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej (Ryc.8). Enzymem najbardziej wrażliwym na działanie LPS okazała się KGDHC. Już stężenie 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS powodowało 42% inhibicję aktywności tego enzymu, która wzrastała do 77 % przy LPS 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ryc.9A). IC_{50} dla tego enzymu wyliczone ze stężeń LPS 0.005-0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wynosiło 0.041 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ryc.9B). Ekspozycja komórek N9 na LPS nie zmieniała aktywności liazy ATP-cytrynianowej (Ryc.10).

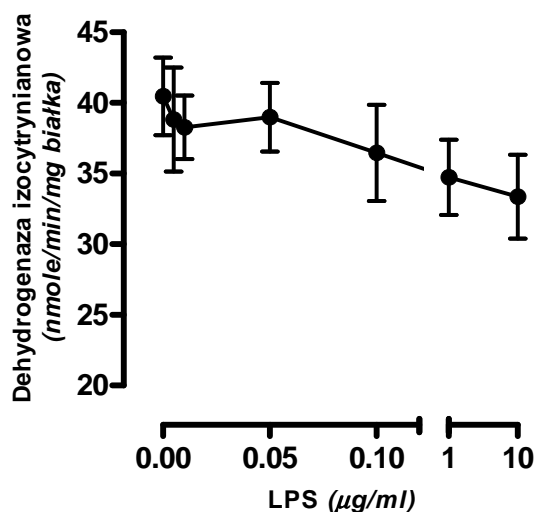
Istnieją odwrotne korelacje pomiędzy śmiertelnością komórek N9, a aktywnością PDHC, KGDHC oraz akonitazy (Ryc.11). Najsilniejszą wykazano dla PDHC ($p=0.004$, Ryc.11A), a 100 razy słabszą dla KGDHC ($p=0.049$, Ryc.11B).



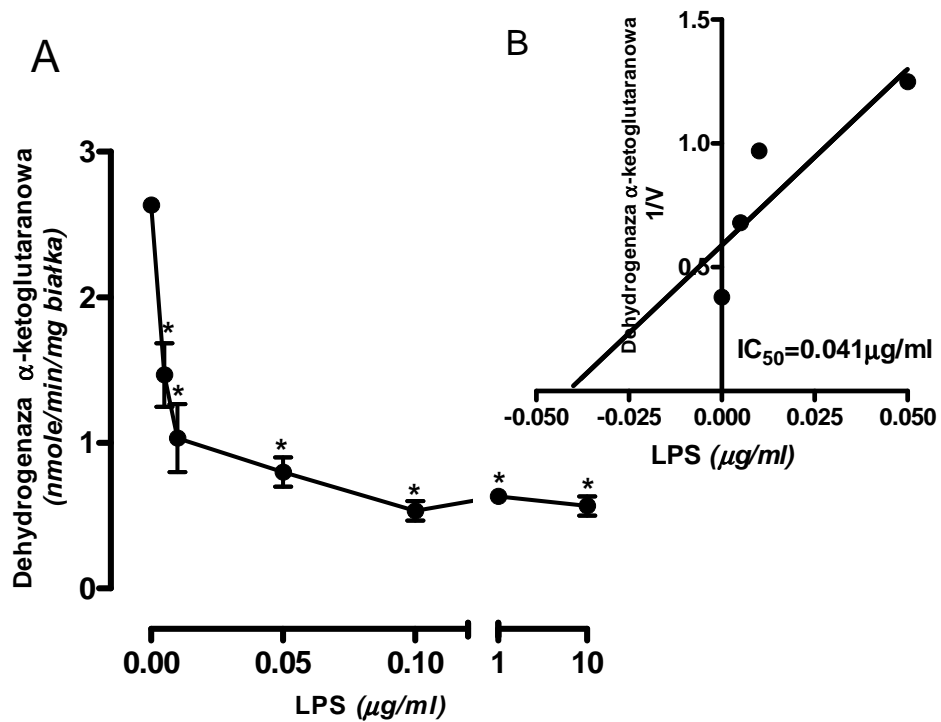
Ryc.6. A) Wpływ LPS na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach N9. B) wykres Dixona dla wpływu LPS na aktywność PDHC. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 4-13 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p<0.05$, ** $p<0.001$



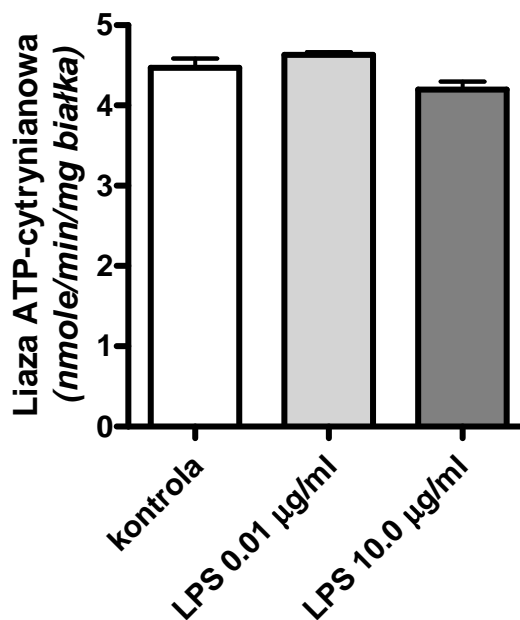
Ryc.7. A) Wpływ LPS na aktywność akonitazy w komórkach N9. B) wykres Dixona dla wpływu LPS na aktywność akonitazy. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-9 doświadczeń. Znamienne różnie od: kontroli, * $p<0.05$, ** $p<0.01$



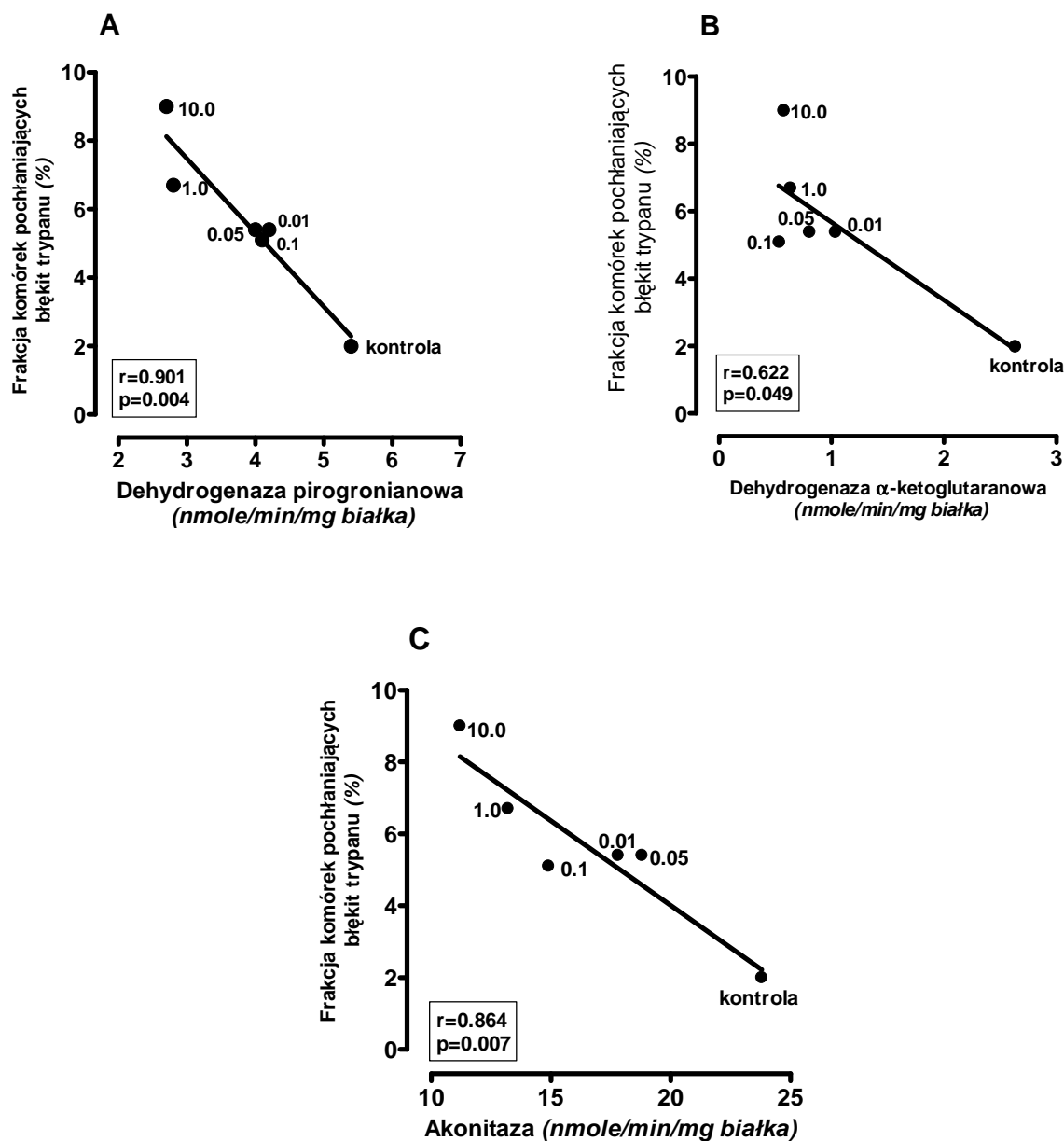
Ryc.8. Wpływ LPS na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3 doświadczeń.



Ryc.9.A) Wpływ LPS na aktywność dehydrogenazy α -ketoglutaranowej w komórkach N9. B) wykres Dixona dla wpływu LPS na aktywność KGDHC. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różnie od: kontroli, * $p < 0.001$



Ryc.10. Wpływ LPS na aktywność liazy ATP-cytrynianowej w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3 doświadczeń.

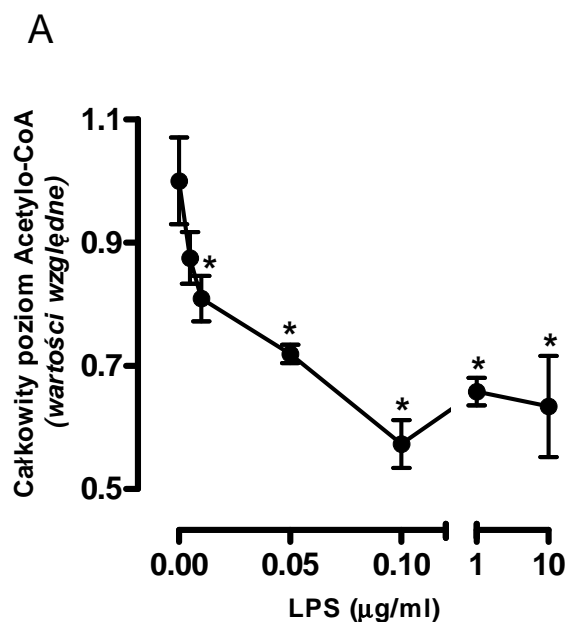


Ryc.11. Odwrotne korelacje pomiędzy frakcją komórek pochłaniających błękit trypanu, a aktywnością PDHC (A), KGDHC (B) i akonitazy (C) w komórkach N9 w obecności LPS w stężeniu od 0.005 do 10.0 μg/mL (wg.danych z Ryc.6, 7, 9). Stężenie LPS w μg/mL oznaczono liczbami.

5.2.4. Przewlekły wpływ lipopolisacharydu na metabolizm energetyczny komórek N9.

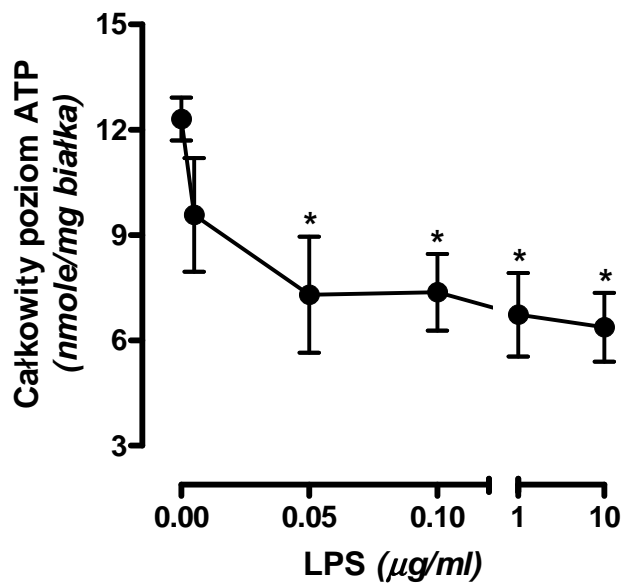
Dodanie do środowiska hodowlanego MEM LPS powodowało po 24-godzinnej ekspozycji, spadek całkowitego poziomu acetylo-CoA w komórkach N9. Już przy stężeniu LPS 0.01 μg/mL całkowity poziom acetylo-CoA obniżał się do

81% wartości wyjściowej. Przy dalszym wzroście stężenia LPS nadal spadał osiągając 60% wartości wyjściowej przy stężeniu LPS w pożywce równym 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ryc.12A).Wzrost stężenia LPS do 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nie powodował dalszego obniżenia poziomu acetylo-CoA.

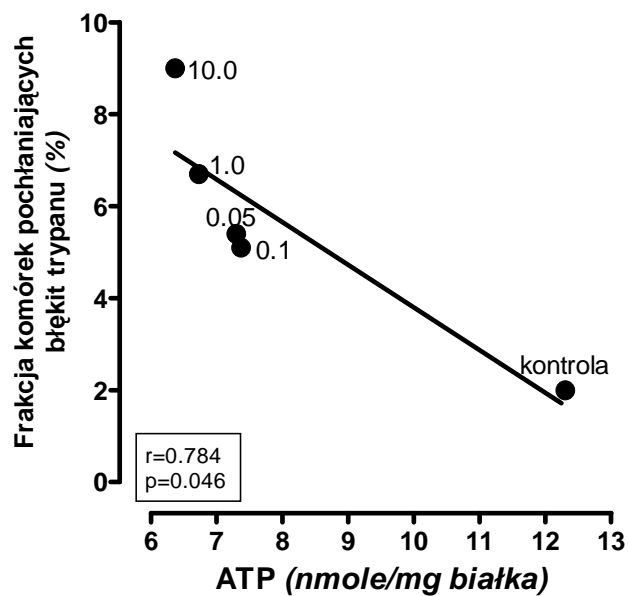


Ryc.12. Wpływ LPS na poziom całkowitego acetylo-CoA. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-14 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p<0.05$

LPS powodował również zależny od stężenia spadek całkowitego poziomu ATP w komórkach N9. LPS w stężeniu 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obniżał stężenie ATP do 59.3% wartości wyjściowej. Dalsze zwiększenie stężenia LPS do 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nieznacznie pogłębiało ten spadek do 51.8% wartości wyjściowej (Ryc. 13). Istnieje odwrotna korelacja pomiędzy poziomem ATP, a wielkością frakcji uszkodzonych komórek N9 w obecności LPS (Ryc.14).



Ryc.13. Wpływ LPS na poziom ATP w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3-8 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli, * $p < 0.01$



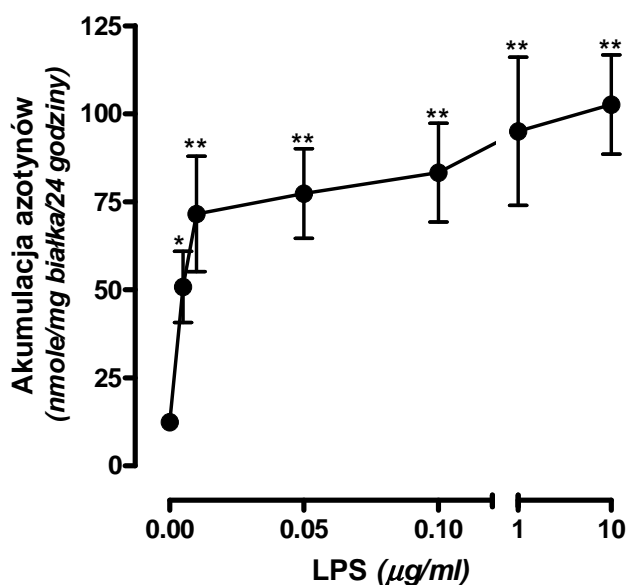
Ryc.14. Odwrotna korelacja pomiędzy całkowitym poziomem ATP, a frakcją komórek N9 pochłaniających błękit trypanu w obecności LPS w stężeniach 0.05-10.0 µg/mL (wg danych z Ryc.4, 13). Stężenie LPS w µg/mL oznaczono liczbami.

5.2.5. Wpływ lipopolisacharydu na wydzielanie azotynów przez komórki N9.

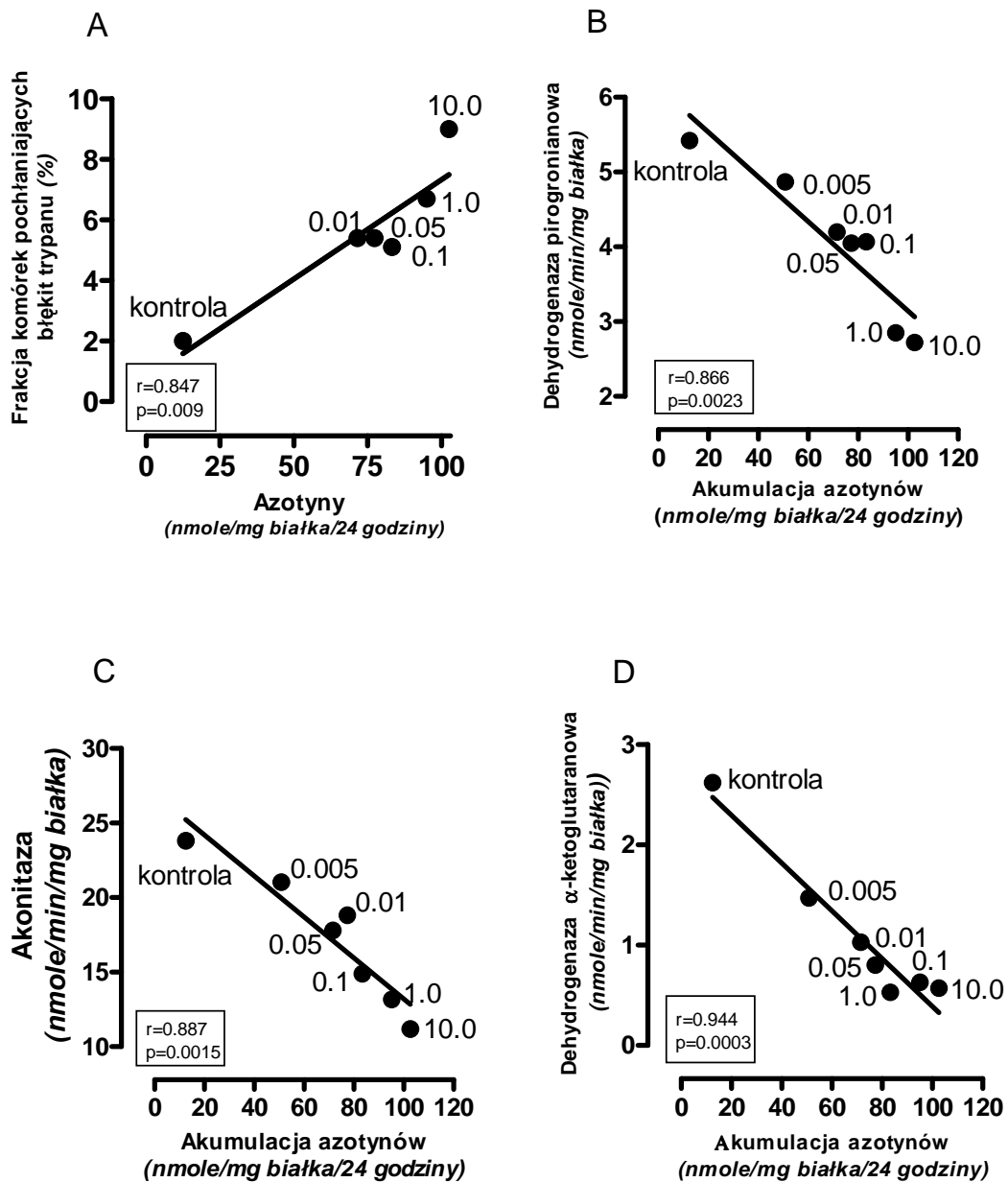
Aktywacja mikrogleju przez LPS odbywa się za pośrednictwem receptora TLR4 (Lehnardt 2010). Jednym ze wskaźników aktywacji mikrogleju jest wzrost wydzielania NO, który następnie ulega utlenieniu do NO₂ i NO₃. Dlatego pomiar akumulacji azotynów w środowisku hodowlanym był przez nas używany w celu oceny integralności czynnościowej mikrogleju N9.

Komórki N9 stymulowane jedną dobę LPS wielokrotnie zwiększały syntezę azotynów. LPS w stężeniu 0.005 µg/mL powodował 4-krotny, a jego 20-krotnie wyższe stężenie: niemal 7-krotny wzrost akumulacji azotynów w pożywce. Dalszy wzrost stężenia LPS do 10.0 µg/mL nie powodował istotnego wzrostu szybkości syntezy NO (Ryc.15). Zwiększeniu szybkości syntezy NO towarzyszył wzrost stopnia uszkodzenia komórek mikroglejowych z wysokim współczynnikiem korelacji (Ryc.16A).

Wykazano istnienie odwrotnych wysoce znamienych korelacji pomiędzy aktywnością trzech enzymów: dehydrogenazy pirogronianowej ($r=0.866$, $p=0.0023$), akonitazy ($r=0.887$, $p=0.0015$) i dehydrogenazy α -ketoglutaranowej ($r=0.944$, $p=0.0003$), a zależną od stężenia LPS akumulacją azotynów (Ryc.16 B, C, D).



Ryc.15. Wpływ lipopolisacharydu na syntezę azotynów przez komórki N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-13 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p<0.05$, ** $p<0.001$



Ryc.16 Korelacje pomiędzy uszkodzeniem komórek (A), aktywnością PDHC (B), akonitazy (C) i KGDHC (D), a akumulacją azotynów w komórkach N9 w obecności LPS w stężeniach 0.005-10.0 $\mu\text{g/mL}$ (wg danych z Ryc.4, 6, 7, 9). Stężenie LPS w $\mu\text{g/mL}$ oznaczono liczbami.

W opisanym wyżej doświadczeniu wpływ LPS na komórki N9 był badany podczas ich ekspozycji na ten czynnik. Nie wiadomo jednak było czy ta aktywacja to zjawisko utrwalone, spowodowane zmianami adaptacyjnymi zachodzącymi w komórkach ekspozowanych na LPS czy też jedynie bezpośredni wpływ tego patogenu. Dlatego wykonano doświadczenie, w których komórki po ekspozycji na

LPS przenoszono na okres 24 godzin do środowiska nie zawierającego tego czynnika (Tabela 2). Wykazano, że komórki N9 po usunięciu LPS nadal wydzielały azotyny do pożywki z szybkością 5.5 krotnie większą niż komórki kontrolne. Wartość ta była jedynie o 20 % niższa w porównaniu do komórek które stale eksponowano na ten czynnik (Tabela 2).

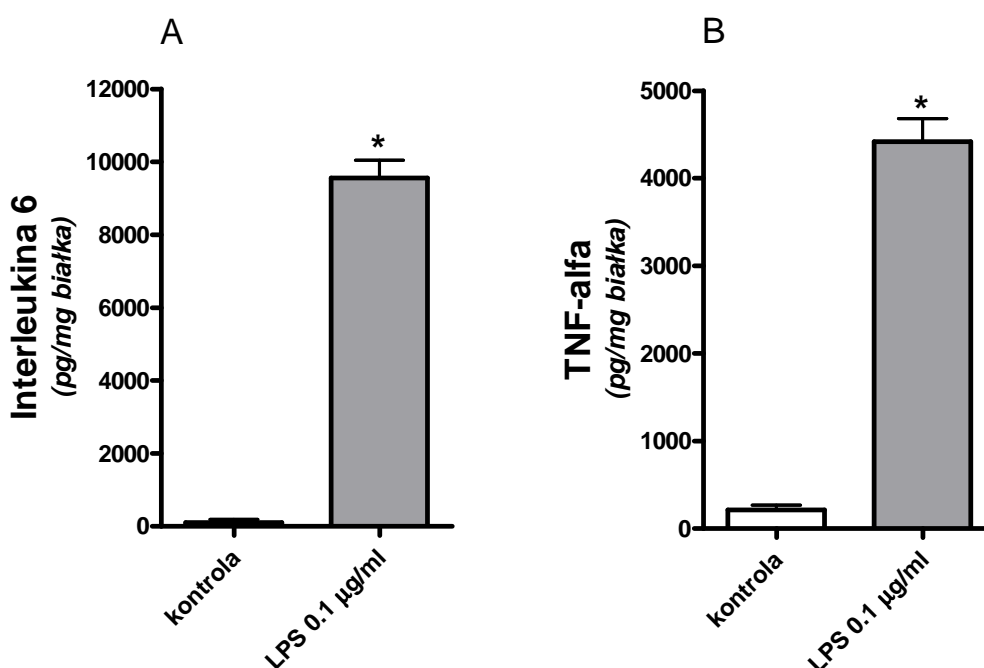
Tabela 2. Wpływ LPS na utrzymywanie wydzielania azotynów w czasie.

POCZĄTEK HODOWLI	GODZINA <u>36</u> HODOWLI	GODZINA <u>48</u> HODOWLI	GODZINA <u>72</u> HODOWLI
Próba nr 1 (pożywka wzrostowa bez LPS) —————→	Wymiana pożywki na nową bez LPS —————→	—————→	Azotyny 26.64±1.08 nmole/mg białka/24godz
Próba nr 2 (pożywka wzrostowa bez LPS) —————→	Wymiana pożywki na nową z LPS (0.01µg/mL) —————→	Wymiana pożywki na nową bez LPS —————→	Azotyny 93.84±4.08* nmole/mg białka/24godz
Próba nr 3 (pożywka wzrostowa bez LPS) —————→	Wymiana pożywki na nową z LPS (0.01µg/mL) —————→	Wymiana pożywki na nową z LPS (0.01µg/mL) —————→	Azotyny 117.84±7.68*# nmole/mg białka/24godz

Wyniki są wartościami średnimi z 1 doświadczenia±SEM z 3 powtórzeń. Znamiennie różne od: próbki nr 1, *p<0.001, próbki nr 2, #p<0.05.

5.2.6. Wpływ lipopolisacharydu na wydzielanie interleukiny 6 oraz TNF- α przez komórki N9.

Innym markerem prawidłowej odpowiedzi mikrogleju na czynniki prozapalne jest wzrost syntezy różnych cytokin. Wykazano, że mikroglej podczas 24-godzinnej ekspozycji na LPS w stężeniu 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, zwiększał wydzielanie IL-6 90-krotnie, a wydzielanie TNF- α 20-krotnie (Ryc.17).



Ryc.17. Wpływ LPS na wydzielanie IL-6 i TNF- α przez komórki N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 2 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.01$

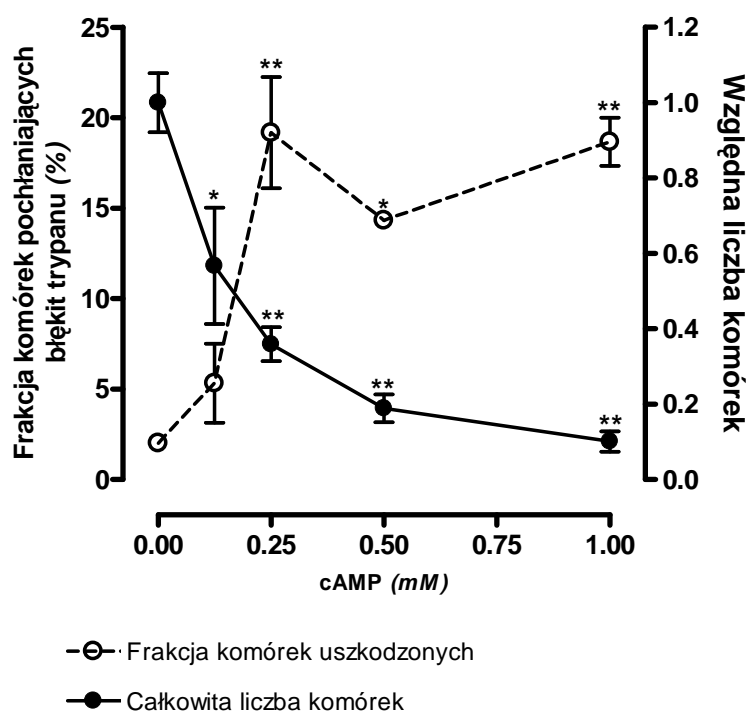
5.3. Fenotypowa modyfikacja komórek N9 przez kwas retinowy i cAMP.

Cykliczny AMP i RA są kluczowymi wewnątrzkomórkowymi przekąźnikami informacji powodującymi zmiany ekspresji wielu genów związanych z dojrzewaniem i podziałami komórek w tym także komórek mikroglejowych (Maden i wsp.2002, Takahaski i wsp.1998, Giulian i Baker 1986). Dlatego w naszych doświadczeniach komórki N9 hodowano przez 48 godzin w pożywce MEM zawierającej 0.001 mM kwas retinowy lub/i 0.25 mM dwumaślan cyklicznego

AMP. Po 48 godzinach pożywkę wzrostową wymieniano na nową nie zawierającą RA i cAMP, ale zawierającą lub nie zawierającą LPS (0.01µg/mL).

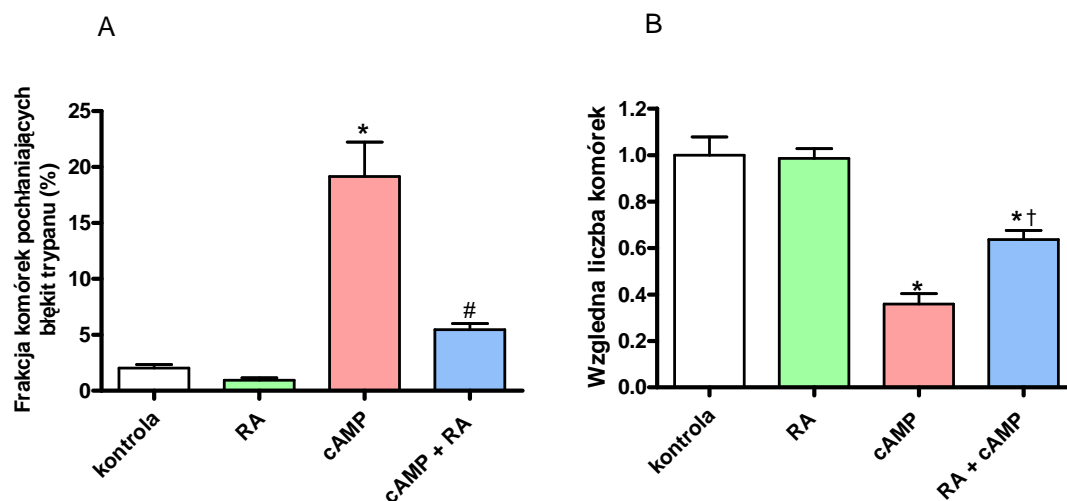
5.3.1. Wpływ RA i cAMP na żywotność komórek N9.

Cykliczny AMP jest wewnątrzkomórkowym efektem różnicowania neuronów. W przypadku mikrogleju N9 powodował zależny od stężenia wzrost ich śmiertelności z 2.0 % w warunkach kontrolnych do 18.7 % przy jego stężeniu 1.0 mmol/L. W tych warunkach także liczba komórek spadała do 10 % wartości kontrolnej (Ryc.18). Przy stężeniu cAMP 0.25 mM liczba komórek spadała o 65% przy ich 19% śmiertelności (Ryc.18). Dlatego w dalszych doświadczeniach używano 0.25 mM stężeń tego nukleotydu.



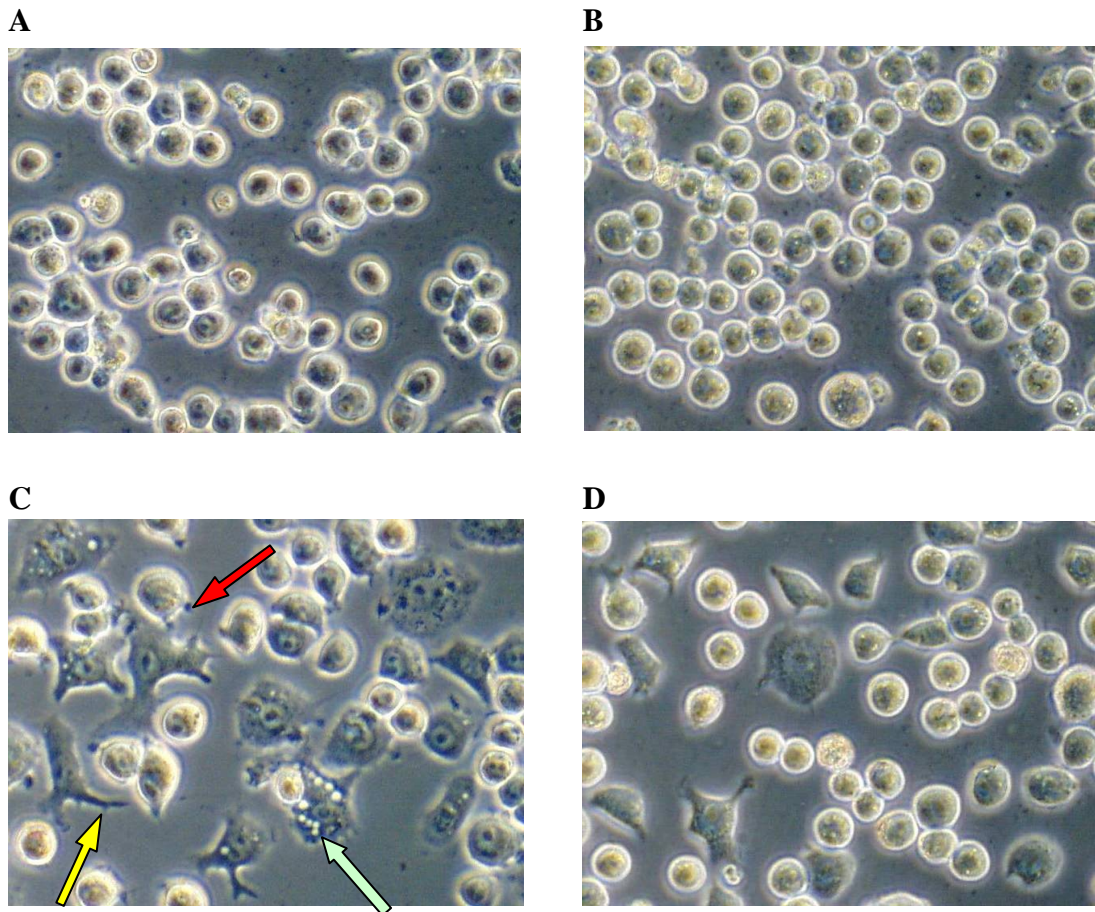
Ryc.18. Zależna od stężenia cAMP cytotoksyczność komórek N9. Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-19 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$




Dodanie do pożywki hodowlanej RA (0.001mM) nie powodowało zmian w liczbie komórek jak również w wielkości frakcji komórek uszkodzonych. Natomiast RA odwracał wywołany dodaniem cAMP (0.25 mM) wzrost śmiertelności oraz częściowo inhibicję szybkości podziałów komórek N9 (Ryc.19).



Ryc.19. Wpływ RA (0.001mM) i cAMP (0.25mM) na żywotność komórek N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 7-19 doświadczeń. Znamienne różnie od: kontroli, * $p < 0.001$; cAMP, # $p < 0.001$; RA, † $p < 0.001$

Komórki N9 w warunkach kontrolnych miały okrągły kształt i były równej wielkości. 48-godzinna ekspozycja mikrogleju N9 na RA 0.001mM nie powodowała zmian okrągłego kształtu charakterystycznego dla komórek N9 (Ryc. 20 B). Natomiast cAMP powodował pojawienie się komórek większych, o kształcie ameboidalnym, przy jednoczesnej zmniejszonej ich liczbie. Część zmienionych komórek posiadała wypustki, a w ich wnętrzu widoczne były wodniczki. Pojawiały się też liczne ziarnistości, które obserwowano zarówno wewnątrz jak i poza komórkami (Ryc.20 C). RA częściowo zapobiegał powstawaniu zmian w komórkach pod wpływem cAMP (Ryc. 20 D).



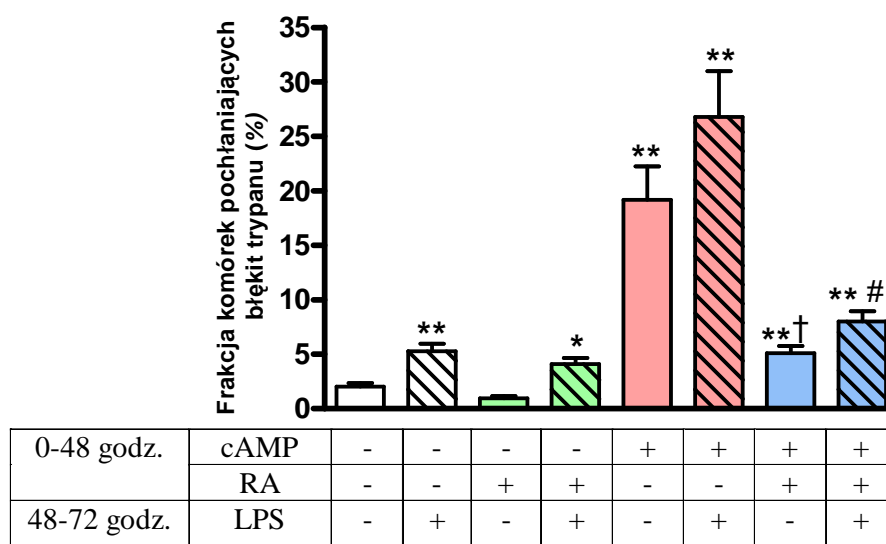
Legenda:  ziarnistość;  wodniczki;  wypustka

Ryc.20. Wpływ kwasu retinowego i cAMP na morfologę komórek N9
 A) kontrola, B) RA 0.001 mM, C) cAMP 0.25 mM, D) RA 0.001 mM i
 cAMP 0.25 mM. Zdjęcia są reprezentatywne dla 5 doswiadczeń.

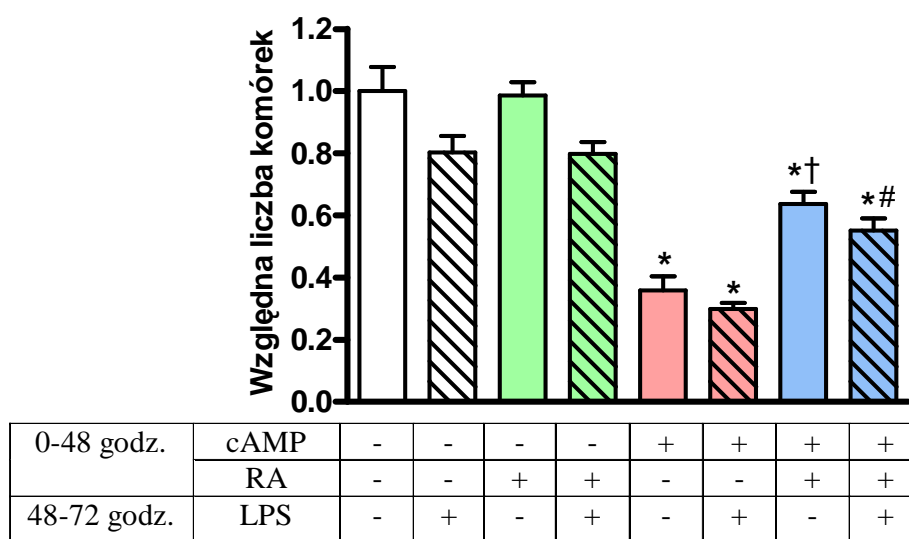
5.3.2. Wpływ LPS na żywotność komórek N9.

Ekspozycja komórek N9 na cAMP i późniejsza ich aktywacja przez LPS powodowała ponad 26% śmiertelność, co odpowiadało sumie oddziaływań każdego z tych dwóch czynników z osobna. Natomiast liczba komórek mikroglejowych w tym przypadku spadała o 70%. (Ryc.21, 22). Modyfikacja fenotypowa komórek N9 inkubowanych z RA nie zabezpieczała wprawdzie mikrogleju przed późniejszym negatywnym wpływem LPS na ich żywotność. Jednak RA częściowo odwracał negatywny wpływ cAMP na żywotność i zdolność proliferacyjną komórek N9 (Ryc.21, 22). RA wykazywał dodatkowo działanie ochronne w stosunku do

komórek, które poddane były działaniu zarówno cAMP jak i LPS. W tych warunkach RA znacznie ograniczał negatywny skojarzony wpływ cAMP i LPS na żywotność komórek mikroglajowych oraz szybkość ich podziałów (Ryc.21, 22).



Ryc.21. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na uszkodzenie komórek N9. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 5-19 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, *p<0.01, **p<0.001; cAMP, †p<0.01; cAMP+LPS, #p<0.01



Ryc.22. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na liczbę komórek N9. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 5-19 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, *p<0.001; cAMP, †p<0.001; cAMP+LPS, #p<0.01

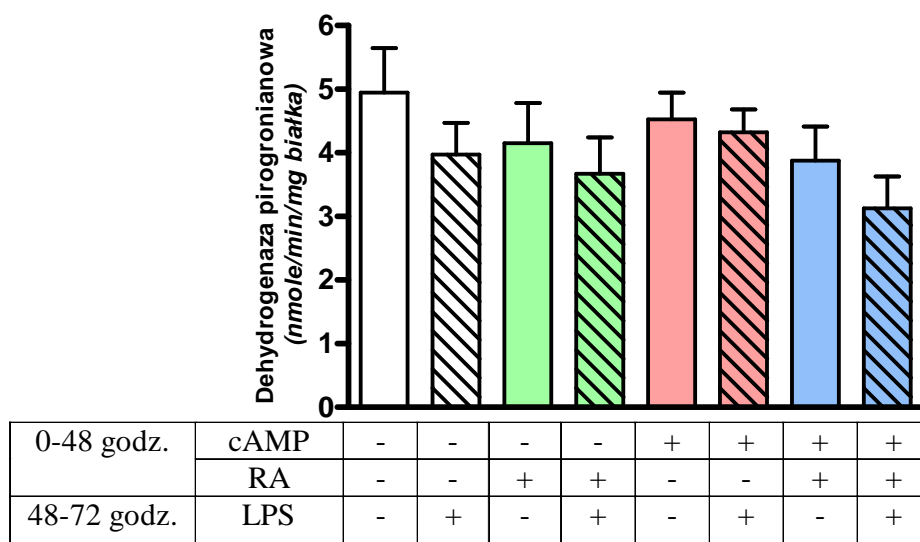
5.3.3. Zależny od fenotypu wpływ LPS na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach N9.

Komórki N9 po 48 godzinnej ekspozycji na RA i/lub cAMP nie wykazywały zmian w aktywności PDHC. Efektory te nie zmieniały również wrażliwości tego enzymu na LPS (0.01µg/mL) (Ryc.23).

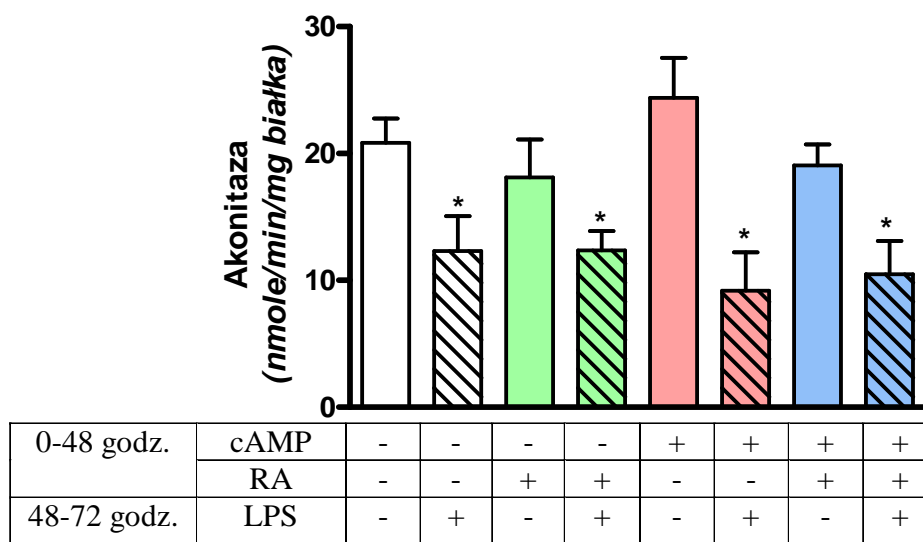
RA i cAMP dodawane osobno lub łącznie również nie powodowały zmian aktywności akonitazy. Czynniki te dodawane razem lub niezależnie do pożywki wzrostowej, nie hamowały ani nie zwiększały inhibicji akonitazy przez LPS (Ryc.24).

Aktywność IDH NADP-zależnej w komórkach N9 nie ulegała zmianie zarówno bez jak i po modyfikacji komórek przez RA, cAMP oraz LPS (Ryc.25).

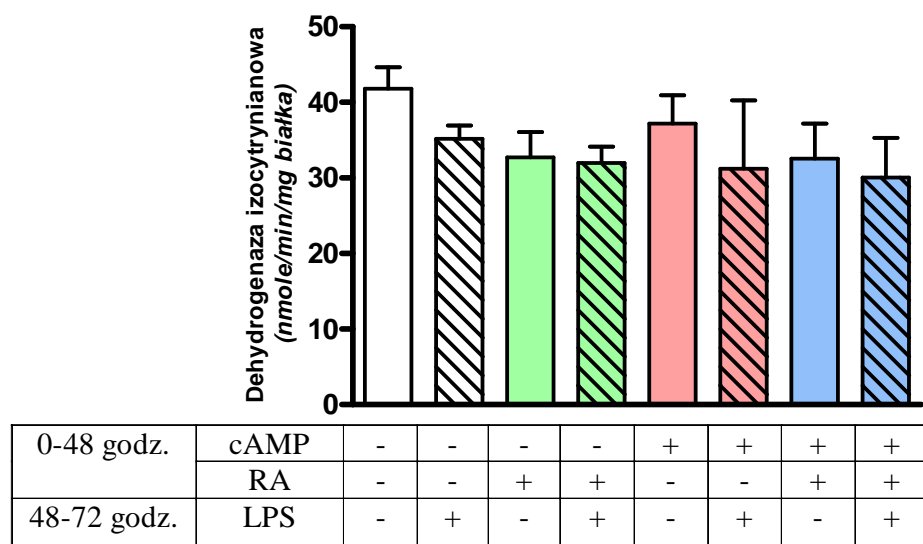
Ekspozycja komórek N9 na 0.01µg/mL LPS powodowała spadek aktywności KGDHC z $1,75 \pm 0.19$ do 0.72 ± 0.14 nmola/min/mg białka co odpowiadało 60% inhibicji tego enzymu. Różnicowanie komórek przez RA hamowało KGDHC w 39%, natomiast sam cAMP nie wpływał na aktywność KGDHC. Ani RA ani cAMP nie modyfikowały supresyjnego działania LPS na ten enzym (Ryc.26).



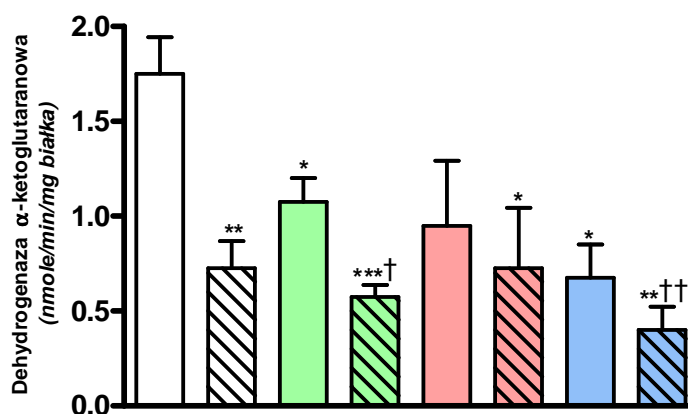
Ryc.23. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 4 doświadczeń.



Ryc.24. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01 μ g/mL) na aktywność akoniatazy w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 5 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * p <0.05



Ryc 25. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01 μ g/mL) na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3 doświadczeń.



0-48 godz.	cAMP	-	-	-	-	+	+	+	+
	RA	-	-	+	+	-	-	+	+
48-72 godz.	LPS	-	+	-	+	-	+	-	+

Ryc. 26. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01 μ g/mL) na aktywność dehydrogenazy α -ketoglutaranowej w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 4 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001; od RA, † p <0.05, †† p <0.01

5.3.4. Zależny od fenotypu wpływ LPS na wybrane parametry metabolizmu energetycznego komórek N9.

5.3.4.1. Acetylo-CoA

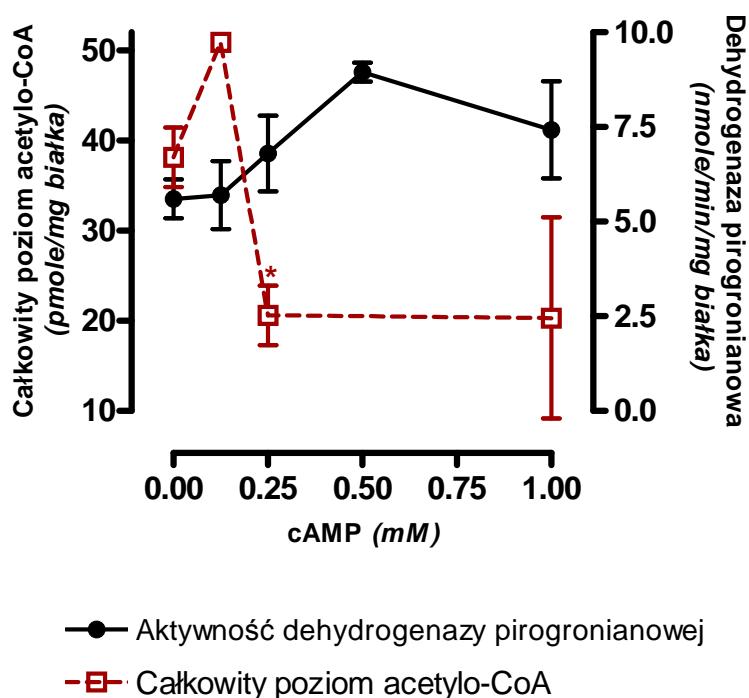
Cykliczny AMP w stężeniu 0.125 mM nie wpływał na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach N9. Jednakże jego 2-krotnie wyższe stężenie powodowało spadek całkowitej zawartości tego parametru w komórkach do 52.1% wartości kontrolnej przy nie zmienionej aktywności PDHC (Ryc.27). Cykliczny AMP (0.25 mM) nie zwiększał również supresyjnego działania LPS (0.01 μ g/mL) na całkowity poziom acetylo-CoA (Ryc.28).

RA w stężeniu 0.001 mM zwiększał całkowity poziom acetylo-CoA o 42.8% w stosunku do wartości kontrolnej (Ryc.28). Jednocześnie całkowicie zapobiegał spadkowi tego parametru na skutek działania LPS, jak również całkowicie odwracał obniżający wpływ cAMP na całkowitą zawartość acetylo-CoA w komórkach (Ryc.28).

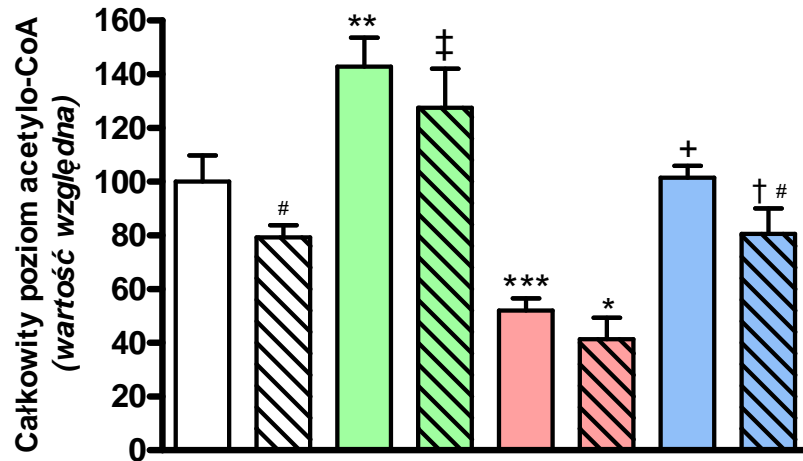
W zastosowanym przez nas schemacie doświadczalnym cAMP oraz cAMP z LPS statystycznie znamienne obniżały zawartość acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym z 5.7 ± 0.3 odpowiednio do 3.7 ± 0.2 oraz 4.0 ± 0.4 pmola/mg białka

(Ryc.29 A). Obniżający wpływ cAMP na poziom tego parametru łącznie był odwracany przez RA. Kwas retinowy częściowo zabezpieczał przez spadkiem mitochondrialnego poziomu acetylo-CoA w warunkach podania do pożywki zarówno cAMP i LPS (Ryc.29 A).

Wykazano istnienie odwrotnej korelacji znamiennej statystycznie pomiędzy całkowitą zawartością acetylo-CoA, a frakcją uszkodzonych komórek N9 ($r=0.748$, $p=0.006$) (Ryc.30).



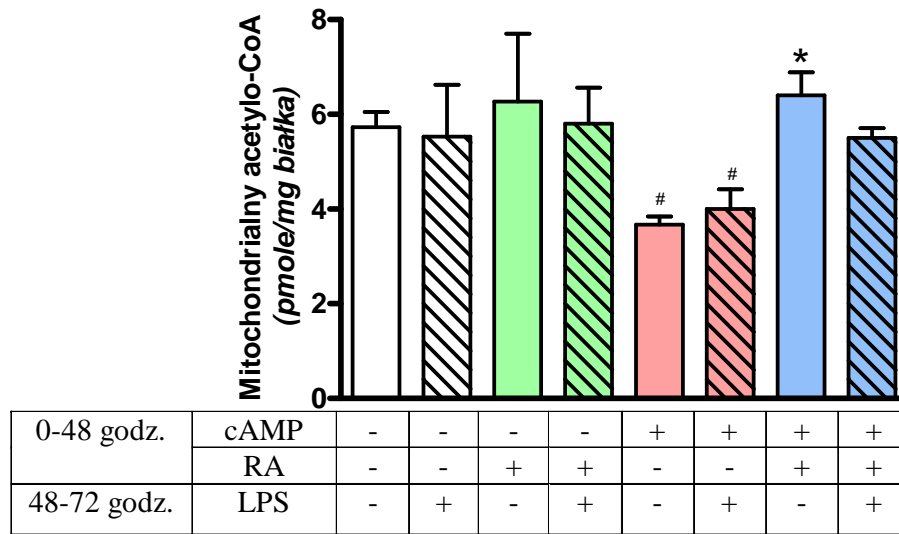
Ryc.27. Wpływ cAMP na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej oraz całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 2-9 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, $*p<0.01$



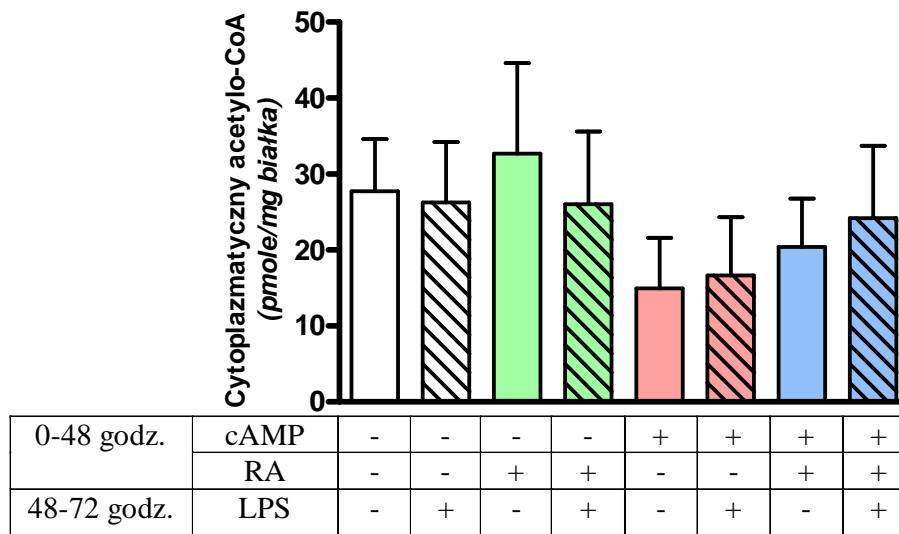
0-48 godz.	cAMP	-	-	-	-	+	+	+	+
	RA	-	-	+	+	-	-	+	+
48-72 godz.	LPS	-	+	-	+	-	+	-	+

Ryc.28. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01µg/mL) na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 7-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001; LPS, ‡p<0.01; RA+LPS, #p<0.05; cAMP, +p<0.001; cAMP+LPS, †<0.01. Wartość względna 100 odpowiada 40.35 pmola/mg białka acetylo-CoA.

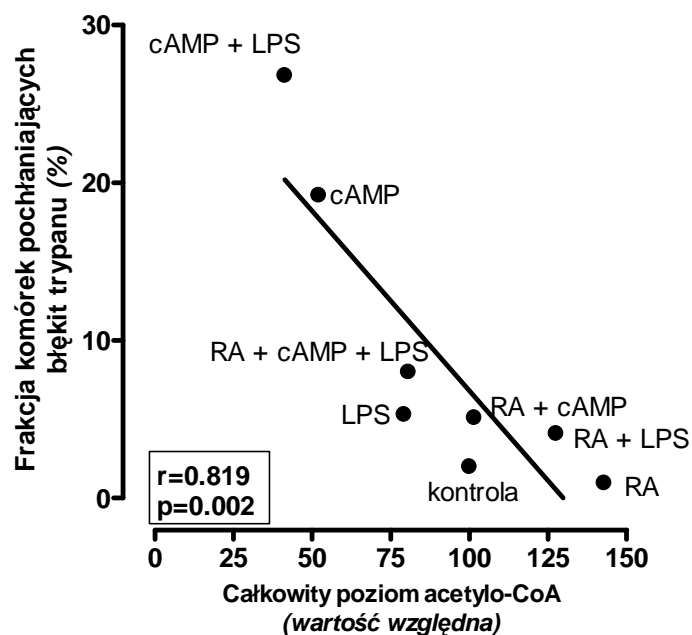
A



B



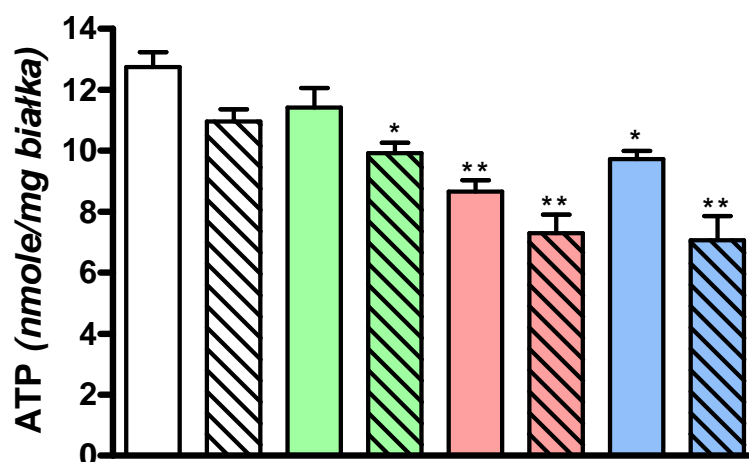
Ryc. 29. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01 μ g/mL) na poziom acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym (A) i cytoplazmatycznym (B) w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, # p <0.01; cAMP, * p <0.01



Ryc.30. Odwrotna korelacja pomiędzy całkowitym poziomem acetylo-CoA w frakcji komórek uszkodzonych (wg danych z Ryc.21, 28).

5.3.4.2. ATP

Nasze badania na linii neuronalnej SN56 wykazały, że poziom ATP zależy od stężenia acetylo-CoA i aktywności PDHC (Ronowska i wsp. 2007). Dlatego zbadano zmiany poziomu tego metabolitu w komórkach mikroglejowych w różnych warunkach doświadczalnych. W komórkach N9 hodowanych z cAMP poziom ATP obniżał się z 12.7 ± 0.5 do 8.7 ± 0.4 nmoli/mg białka. Supresyjne działanie cAMP na poziom ATP nie było odwracane przez RA (Ryc.31). Również sam RA nie wpływał na poziom ATP. Nie zabezpieczał on komórek mikroglejowych przed supresyjnym działaniem LPS oraz cAMP z LPS na ten parametr (Ryc.31).



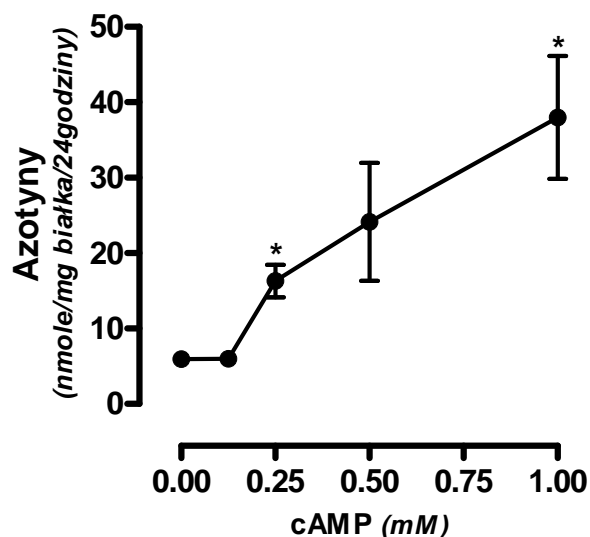
0-48 godz.	cAMP	-	-	-	-	+	+	+	+
	RA	-	-	+	+	-	-	+	+
48-72 godz.	LPS	-	+	-	+	-	+	-	+

Ryc 31. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01 μ g/mL) na całkowity poziom ATP w komórkach N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 5-7 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * p <0.01, ** p <0.001

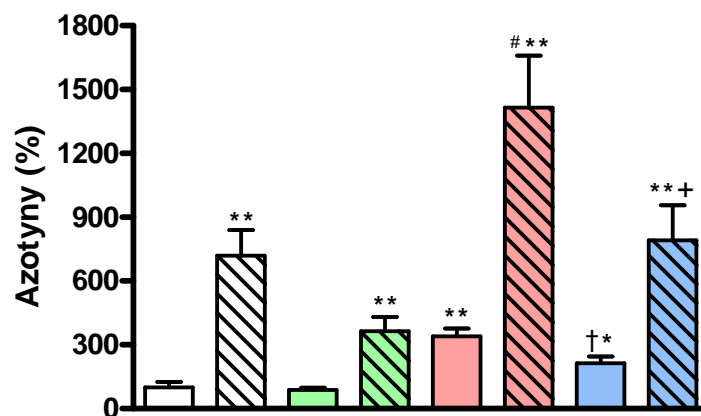
5.3.5. Wpływ RA i cAMP na syntezę azotynów przez komórki N9.

LPS w stężeniu 0.01 μ g/mL powodował 7.2 krotny wzrost wydzielania azotynów przez komórki N9. Sam kwas retinowy (0.001mM) nie wpływał na szybkość syntezy azotynów przez komórki N9 lecz częściowo, bo w 50 % hamował aktywujące działanie LPS (Ryc.33). Z kolei cAMP (0.25mM) powodował 3.4-krotny wzrost wydzielania azotynów. Wzrost ten był zależny od stężenia cAMP, gdyż przy stężeniu 0.125 mM nie obserwowano zmian w szybkości syntezy NO. Natomiast 1.0 mM cAMP powodował, ponad 6- krotny wzrost NO w stosunku do kontroli (Ryc.32). LPS i cAMP działały synergistycznie zwiększając akumulację azotynów do 14 razy w stosunku do kontroli. RA częściowo odwracał aktywujący wpływ cAMP oraz skojarzone działanie cAMP i LPS na syntezę NO (Ryc.33).

Istnieje statystycznie znamienne korelacja pomiędzy wielkością frakcji uszkodzonych komórek N9, a produkcją przez nie azotynów ($r=0.548$, $p=0.036$) (Ryc.34).

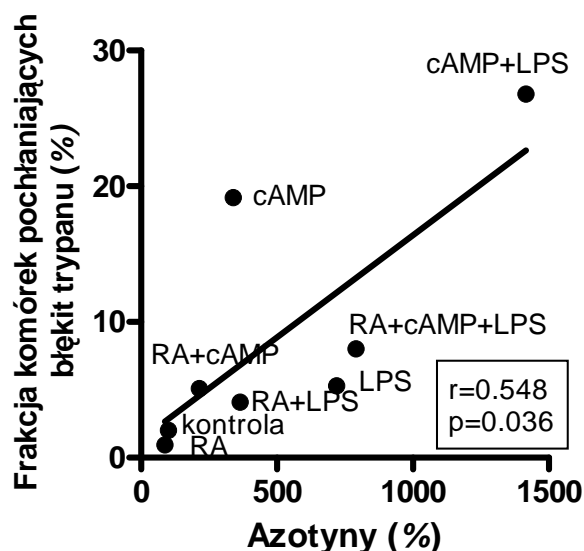


Ryc.32. Zależna od stężenia cAMP synteza azotynów przez komórki N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.05$



0-48 godz.	cAMP	-	-	-	-	+	+	+	+
	RA	-	-	+	+	-	-	+	+
48-72 godz.	LPS	-	+	-	+	-	+	-	+

Ryc.33. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.01 μ g/mL) na wydzielanie azotynów przez komórki N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-12 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; LPS, # $p < 0.01$; cAMP, † $p < 0.05$; cAMP+LPS, + $p < 0.01$



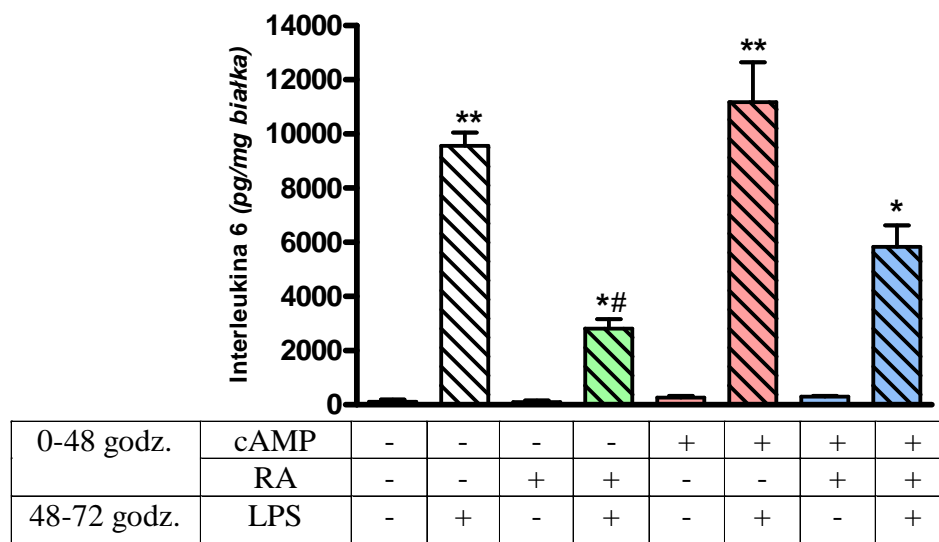
Ryc.34. Korelacja pomiędzy frakcją uszkodzonych komórek N9 a produkcją azotynów (wg danych z Ryc.22, 33)

5.3.6. Wpływ RA i cAMP na wydzielanie IL-6 i TNF- α przez komórki N9.

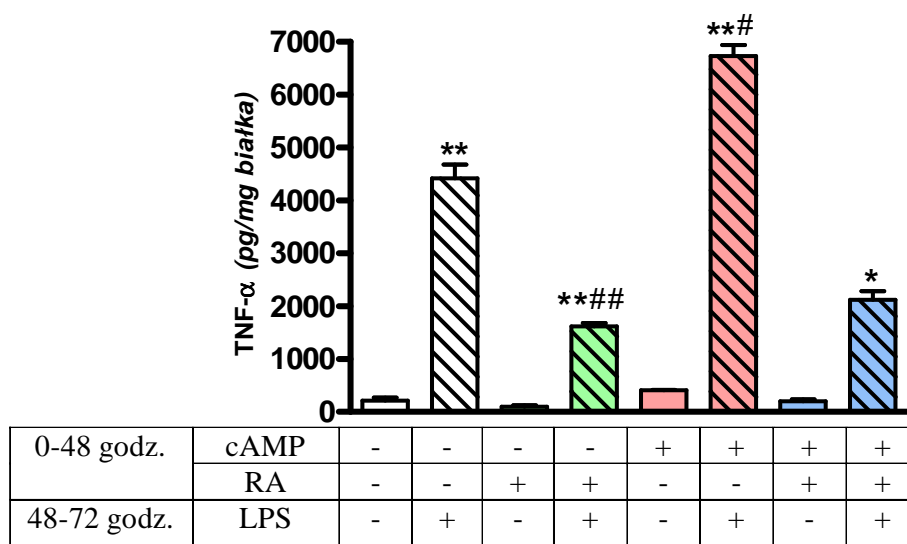
Pierwotne linie mikrogleju reagują wzrostem syntezy wskaźników zapalnych m.in. cytokin (Chang i wsp. 2001, Nakamura i Kataoka 1999). Dlatego sprawdziliśmy czy mikroglej N9 posiada również i tę właściwość. W warunkach spoczynkowych komórki N9 wydzielały śladowe ilości IL-6 i TNF- α (Ryc. 35, 36). LPS w stężeniu 0.01 μ g/mL powodował ponad 90-krotny wzrost wydzielania IL-6 oraz ponad 20-krotny wzrost wydzielania TNF- α przez komórki N9 (Ryc.35, 36). Sam Kwas retinowy nie zmieniał ani wydzielania IL-6 ani TNF- α . Jednak znacznie ograniczał on zależny od LPS wzrost wydzielania IL-6 -spadek o 70.6 %, jak i TNF- α -spadek o 65 % (Ryc. 35, 36).

Cykliczny AMP dodawany oddzielnie nie wpływał na szybkość syntezy badanych cytokin. Jednak zwiększał on wywołany przez LPS wzrost wydzielania TNF- α o 52% oraz IL-6 o 17 %. (Ryc. 35, 36).

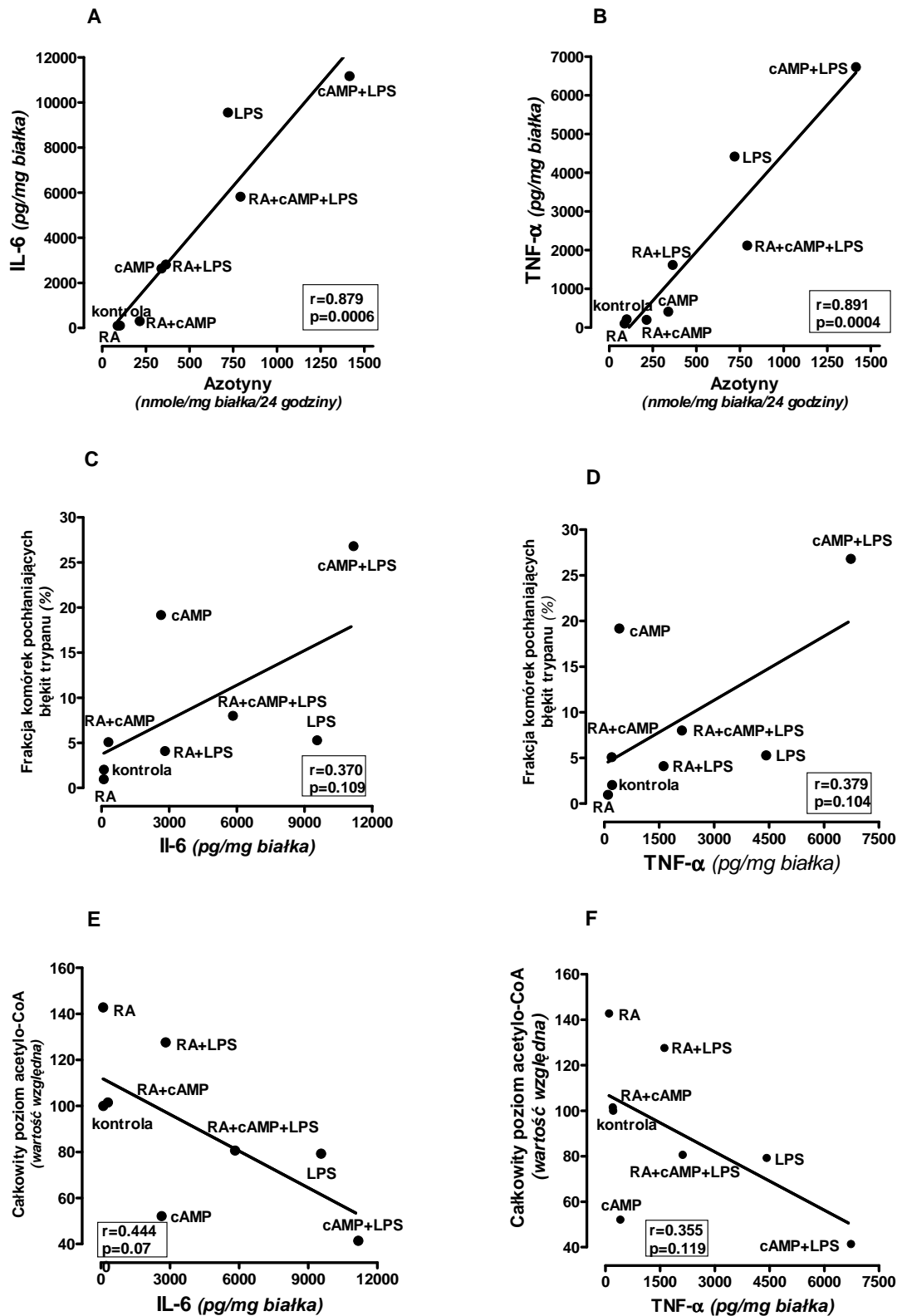
Istnieją wysoce znamienne korelacje pomiędzy szybkością syntezy IL-6 i TNF- α , a szybkością syntezy NO przez komórki mikroglejowe N9 (Ryc.37 A, B). Brak jest jednak znamiennej zależności pomiędzy szybkością syntezy obu cytokin, a śmiertelnością (Ryc.37 C, D) i całkowitym poziomem acetylo-CoA (Ryc.37 E, F) w tych komórkach.



Ryc.35. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.1 μ g/mL) na wydzielanie IL-6 przez komórki N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 2 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * p <0.01, ** p <0.001; LPS, # p <0.01



Ryc.36. Wpływ RA (0.001 mM), cAMP (0.25 mM) i LPS (0.1 μ g/mL) na wydzielanie TNF- α przez komórki N9. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 2 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * p <0.01, ** p <0.001; LPS, # p <0.05, ## p <0.01

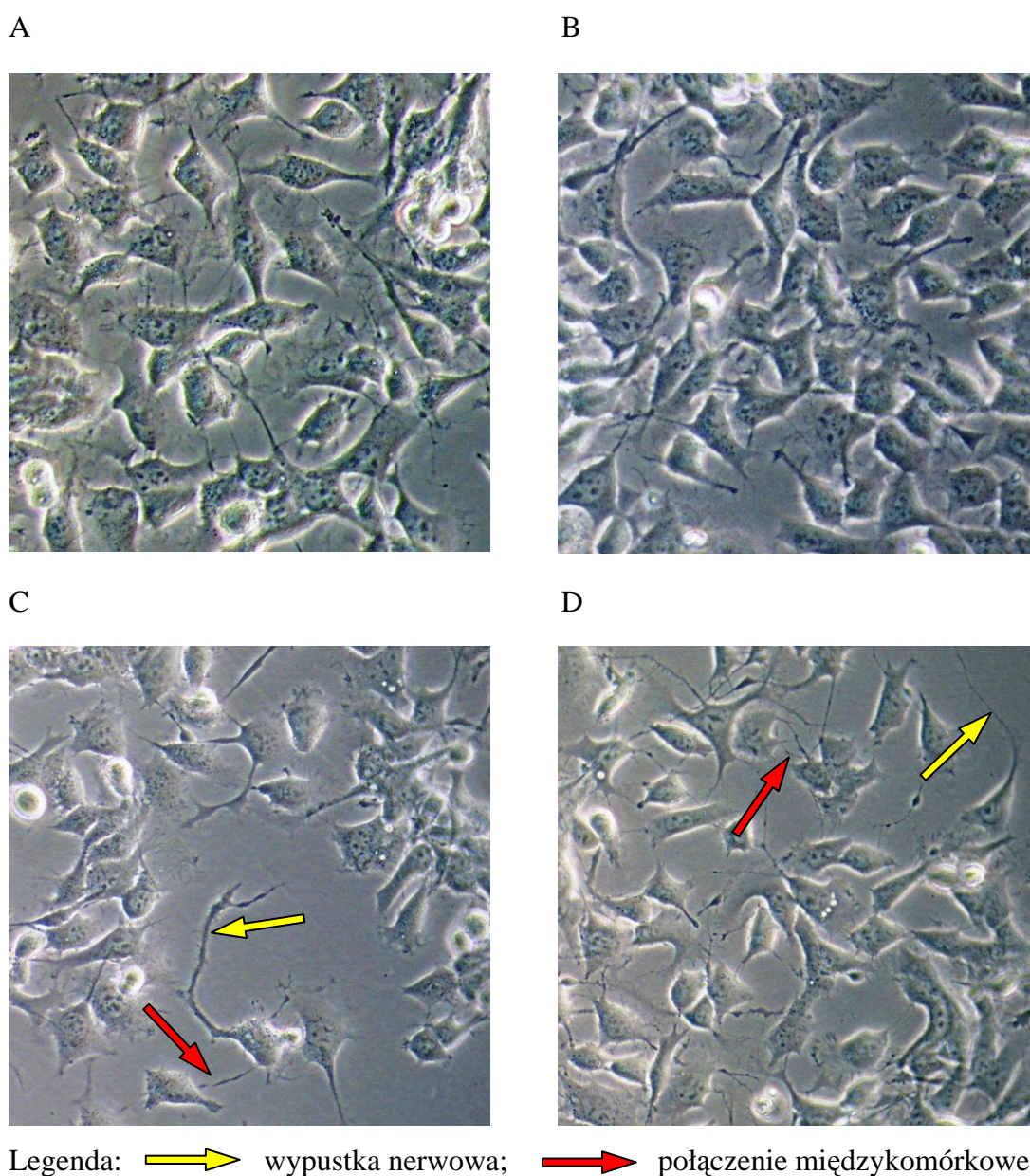


Ryc.37. Korelacje pomiędzy syntezą IL-6 (A) i TNF- α (B), a syntezą NO; między frakcją uszkodzonych komórek, a syntezą Il-6 (C) i TNF- α (D) oraz między całkowitym poziomem acetylo-CoA, a syntezą Il-6 (E) i TNF- α (F). Według danych z Ryc. 21, 28, 33, 36, 37.

5.4. Wpływ lipopolisacharydu na neurony cholinergiczne SN56.

5.4.1. Neurotoksyczność cholinergiczna LPS.

Wiadomo, że LPS nie wpływa na żywotność i różne parametry metaboliczne dojrzałych neuronów cholinergiczych i niecholinergiczych kory mózgu (Lehnardt i wsp. 2003). Jednak brak danych dotyczących reakcji neuronów cholinergiczych przegrody mózgu. Dlatego w pracy tej sprawdzono, czy komórki cholinergiczne SN56 wyprowadzone z przegrody mózgu będą reagowały na ten bodziec patologiczny.



Ryc.38. Wpływ kwasu retinowego (0.001 mM) i cAMP (1.0 mM) na morfologię komórek SN56: A) KN kontrola B) KN +LPS C) KR kontrola D) KR + LPS

LPS w stężeniu 1.0 µg/mL po 24-godzinnej hodowli nie wpływał ani na liczbę ani wielkość frakcji komórek uszkodzonych zarówno w populacji komórek SN56 niezróżnicowanych (KN) jak i zróżnicowanych (KR) kwasem retinowym i cAMP (Tabela 3). LPS nie powodował również zmian w morfologii komórek SN56 ekspozycjonowanych na LPS (Ryc.38).

5.4.2. Wpływ LPS na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego komórek SN56.

LPS w stężeniu 1.0 µg/mL nie powodował zmian w aktywności PDHC, akonitazy, KGDHC oraz IDH-NADP zależnej, zarówno w nieróżnicowanych jak i w różnicowanych komórkach cholinergicznym SN56 (Tabela 3). Nie zmieniał również ich całkowitego poziomu acetylo-CoA w komórkach jak również aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT).

5.4.3. Wpływ LPS na wydzielanie azotynów przez komórki SN56.

Brak jest wpływu LPS na wydzielanie azotynów przez komórki SN56 (Tabela 3).

Tabela 3. Wpływ LPS na komórki cholinergiczne SN56.

PARAMETR	KN		KR	
	kontrola	LPS	kontrola	LPS
Dehydrogenaza pirogronianowa (<i>nmole/min/mg białka</i>)	8.3 ± 2.0	7.7 ± 0.4	7.6 ± 0.4	7.9 ± 0.9
Akonitaza (<i>nmole/min/mg białka</i>)	33.3 ± 3.5	33.3 ± 4.0	30.1 ± 2.1	29.6 ± 2.3
Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP-zależna (<i>nmole/min/mg białka</i>)	19.6 ± 0.6	19.2 ± 0.8	17.5 ± 0.4	18.0 ± 0.5
Dehydrogenaza α-ketoglutaranowa (<i>nmole/min/mg białka</i>)	8.3 ± 0.2	7.7 ± 0.4	3.9 ± 0.6	4.0 ± 0.3
Całkowity poziom Acetylo-CoA (<i>pmole/mg białka</i>)	28.3±0.9	28.3±1.5	28.0±0.5	28.1±0.6
Acetylotransferaza cholinowa (<i>nmole/min/mg białka</i>)	0.12±0.008	0.11±0.007	0.20±0.009	0.20±0.006
Wydzielanie azotynów (<i>nmole/mg białka</i>)	5.2 ± 0.5	4.6 ± 0.5	5.4 ± 0.7	5.4 ± 0.6
Całkowita liczba komórek (<i>mln</i>)	5.5 ± 0.5	6.2 ± 0.9	4.8 ± 0.1	5.2 ± 0.8
Fracja komórek uszkodzonych (%)	2.7 ± 0.3	4.0 ± 0.6	4.3 ± 0.7	3.3 ± 0.9

Wyniki są wartościami średnimi ±SEM z 3 doświadczeń. KN-komórki niezróżnicowane. KR- komórki zróżnicowane przez cAMP i kwas retinowy. LPS użyty był w stężeniu 1.0 µg/mL

6. DYSKUSJA

6.1. Porównanie parametrów metabolicznych komórek N9 i SN56

Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że komórki mikroglejowe N9 charakteryzują się niższą w stosunku do neuronalnych komórek cholinergicznych SN56 aktywnością PDHC-enzymu odpowiedzialnego za syntezę acetylo-CoA (Tabela 1). Jednocześnie całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach mikroglejowych był o 33% wyższy niż w neuronach SN56 (Tabela 1). W komórkach mikroglejowych niższe były również aktywności niektórych enzymów związanych ze zużyciem acetylo-CoA w cyklu kwasów trójkarboksylowych takich jak: akonitazy oraz KGDHC (Tabela 1). Opisane powyżej różnice mogą wynikać z faktu, że w komórkach cholinergicznych acetylo-CoA służy nie tylko do produkcji energii, ale również do syntezy neuroprzekaźnika acetylocholin. Dlatego pomimo wyższej aktywności PDHC w komórkach SN56 i związanej z tym większej szybkości syntezy acetylo-CoA, całkowity poziom tego metabolitu był niższy. (Tabela 1). Może to być spowodowane wyższym niż w mikrogleju zużyciem acetylo-CoA przez cholinergiczne komórki neuronalne, wynikającym z większej częstotliwości ich depolaryzacji i repolaryzacji. Wiadomo bowiem, że częstość cykli depolaryzacyjno-repolaryzacyjnych w neuronach cholinergicznych wynosi do 50 Hz, podczas gdy częstość potencjału czynnościowego mikrogleju kilka Hz. Z drugiej jednak strony wyższy poziom acetylo-CoA w mitochondriach komórek neuronalnych byłby zgodny z wyższą aktywnością PDHC, a tym samym i szybkością jego syntezy (Tab.1). Również dwukrotnie wyższy poziom całkowitego ATP w komórkach neuronalnych byłby zgodny z ich wyższymi aktywnościami PDHC i KGDHC. KGDHC jest elementem ograniczającym szybkość przepływu metabolicznego w cyklu kwasów trójkarboksylowych. Stąd wysoki poziom ATP w neuronach byłby więc kompatybilny z wysoką aktywnością KGDHC w tych komórkach. Z kolei niskie stężenie ATP w komórkach N9 odpowiadałoby niskim aktywnościom KGDHC (Ryc.9A, Tab.1).

Ponieważ synteza acetylocholin w SN56 odbywa się w ich cytoplazmie komórek, dlatego acetylo-CoA powstający w mitochondriach musi zostać przetransportowany do cytoplazmy. Enzymami zaangażowanymi w pośredni transport acetylo-CoA do cytoplazmy są acetylotransferaza karnitynowa oraz liaza ATP-cytrynianowa, to może tłumaczyć ich wysokie poziomy w neuronalnych komórkach cholinergicznych

(Tab.1). Wyniki te potwierdzają naszą wcześniejszą hipotezę, że liaza ATP-cytrynianowa jest zlokalizowana preferencyjnie w zakończeniach neuronów cholinergiczných w związku z dostarczaniem reszt acetylowych do syntezy acetylocholíny w cytoplaźmie. (Szutowicz i wsp. 1982, Szutowicz i Łysiak 1980). Również dane dotyczące aktywności dehydrogenazy α -ketoglutaranowej w komórkach cholinergiczných pozostają w zgodzie z danymi innych autorów, według których rejony w mózgu bogate w acetylotransferazę cholinową-enzym odpowiedzialny za synteżę acetylocholíny z choliny i acetylo-CoA, mają wysoki poziom KGDHC (Calingasan i wsp.1994). W tym przypadku wysoka aktywność KGDHC zapewniałaby odpowiednią podaż energii niezbędną do akumulacji acetylocholíny w pęcherzykach synaptycznych oraz do utrzymania potencjału błonowego przy aktywności częstości cykli depolaryzacyjno-repolaryzacyjnych na poziomie 50 Hz. Tak więc, wysokie aktywności PDHC, KGDHC oraz liazy ATP-cytrynianowej w neuronach cholinergiczných zapewniałyby im zarówno właściwy poziom produkcji energii jak i transport reszt acetylowych niezbędnych do syntezy i wydzielania tego neuroprzekaźnika. Z kolei niskie aktywności tych enzymów w mikrogleju odpowiadałyby niższemu zapotrzebowaniu energetycznemu w warunkach spoczynkowych. Jednakże powodowałyby to niedobory energetyczne w tych komórkach w przypadku ich aktywacji.

Dystrybucja białka pomiędzy frakcję mitochondrialną i cytoplazmatyczną komórek neuronalnych SN56 i glejowych N9 była podobna. Wskazuje to na podobną gęstość mitochondriów w obu typach komórek. Z drugiej strony wyższy poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA w mikrogleju niż w neuronach może wynikać z wolniejszego tempa jego zużycia w różnych procesach syntezy. Jednym z czynników powodujących niższy poziom acetylo-CoA w neuronach mogłoby być jego zużycie do syntezy acetylocholíny w reakcji katalizowanej przez ChAT (Szutowicz i wsp. 2000, Tab.1).

6.2. Wpływ LPS na komórki mikroglejowe N9

6.2.1. Wpływ LPS na śmiertelność

Nasze badania wykazały, że 24 godzinna ekspozycja komórek mikroglejowych N9 na LPS powodowała zależny od stężenia wzrost śmiertelności tych komórek (Ryc.4). Ta obserwacja pozostaje w zgodzie z innymi badaniami *in vitro* wykazującymi, że w wyniku działania LPS lub LPS i IFN- γ komórki

mikroglejowe wchodzą na drogę apoptozy (Chenais i wsp.2002, Liu i wsp. 2001, Lee i wsp. 2001, Mayo i Stein 2007). Ta zaprogramowana śmierć komórek mikroglejowych została wykazana poprzez pojawienie się fragmentacji jądrowego DNA, kondensację chromatyny, wydzielanie cytochromu c do cytoplazmy oraz eksternalizację fosfatydyloseryny (Liu i wsp. 2001, Chenais i wsp. 2002, Lee i wsp. 2001). Odnotowano również indukcję kaspazy 2, 3, 7 i 11 oraz pro-apoptotycznych białek Bax i Bak (Mayo i Stein 2007). Potwierdzają to wyniki naszych badań wykazujące wzrost frakcji komórek zatrzymujących błękit trypanu (Ryc.4). Przyczyną wzrostu śmiertelności mogłoby być obniżenie poziomu acetylo-CoA w zaktywowanych komórkach (Ryc.12).

6.2.2. Wpływ LPS na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego komórek N9

LPS jest najsilniejszym jak dotąd poznanym patogenem stymulującym reakcje zapalne limfocytów w krążeniu ogólnym oraz mikrogleju w przestrzeniach intratekalnych mózgu. 24-godzinna ekspozycja komórek mikroglejowych na LPS nie powodowała znamiennych statystycznie zmian w aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej (Ryc.8). Natomiast warunki te powodowały inhibicję aktywności dehydrogenazy pirogronianowej, akonitazy i dehydrogenazy α -ketoglutaranowej, które są kluczowymi enzymami dostarczającymi acetylo-CoA oraz regulującymi przepływ metaboliczny przez cykl kwasów trójkarboksylowych (Ryc.6, 7, 9). W naszych doświadczeniach wzrost śmiertelności mikrogleju po podaniu LPS korelował z jednoczesnym zahamowaniem aktywności wielu enzymów: PDHC, KGDHC i akonitazy (Ryc.11). Mechanizmy inhibicji tych enzymów nie zostały wyjaśnione. Wiadomo bowiem, że LPS nie wywiera bezpośredniego wpływu na ich aktywność w homogenatach (dane nieopublikowane). Można przypuszczać, że wiążą się one z inhibicją PDHC i KGDHC przez zwiększony poziom wewnątrzkomórkowego Ca. Wiadomo bowiem, że LPS w stężeniu 1.0 $\mu\text{g/ml}$, powodował 46% wzrost akumulacji tego kationu w mikrogleju pierwotnym (Aaron i wsp. 2009). Z kolei nasze badania wykazały, że NO hamuje aktywność zarówno akonitazy jak i PDHC i KGDHC w komórkach neuronalnych SN56 (Bielarczyk i wsp. 2006, Bielarczyk i wsp. 3003a)

LPS wywołuje zmiany adaptacyjne w metabolizmie energetycznym komórek N9 wynikające prawdopodobnie z zahamowania aktywności PDHC (Ryc.6) Obserwacje

te potwierdzają wcześniejsze badania wskazujące, że PDHC jest enzymem wrażliwym na stres oksydacyjny, przy czym szczególnie negatywny wpływ przypisuje się ONOO⁻ (Martin i wsp.2005, Richards i wsp.2006). Nadtlenkoazotyny są reaktywnymi formami azotu powstającymi w nieenzymatycznej reakcji O₂⁻ z NO. Uważa się, że negatywny wpływ ONOO⁻ na PDHC polega na S-nitrozowaniu grup SH cysteiny i metioniny oraz nitrowaniu reszt tyrozyny znajdujących się w podjednostkach E1(β), E2 i E3 kompleksu PDH (Elfering i wsp. 2004, Martin i wsp.2005, Richards i wsp.2006).

Tezę tą potwierdzają również nasze wcześniejsze badania z zastosowaniem nitroprusydku sodu jako generatora NO, w których dochodziło do spadku aktywności PDHC w cholinergicznym komórkach SN56 (Bielarczyk i wsp.2006). Odwracanie tej inhibicji przez liponian wskazywało, że zahamowanie wynikało z interakcji NO podjednostkami katalitycznymi E2 kompleksów PDHC i KGDHC. Istnienie odwrotnej korelacji pomiędzy aktywnością PDHC, a syntezą NO przez komórki mikroglejowe N9 (r=0.866, p=0.0023) jest zgodne z hipotezą o inhibicyjnym wpływie reaktywnych form azotu na aktywność tego enzymu (Ryc.16B).

Doświadczenia przedstawione w pracy wykazały, że spośród zbadanych przez nas enzymów akonitaza ulegała najsłabszemu hamowaniu pod wpływem LPS [IC₅₀]= 0.239 µg/mL) (Ryc.7 B). Inhibicyjny wpływ LPS na akonitazę potwierdzają również inni badacze. I tak, 16-godzinna hodowla komórek mikroglejowych w środowisku z 50ng/ml LPS oraz 20U/ml IFN γ powodowała 97 % spadek aktywności akonitazy we frakcji mitochondrialnej (Chenais i wsp.2002). Również w innych pracach wykazywano, że powodem hamowania akonitazy u ssaków jest akumulacja O₂⁻, NO, NOO⁻ oraz H₂O₂, a mechanizm polega na wiązaniu wolnych rodników z siarkowo-żelazową grupą prostetyczną tego enzymu (Gardner i wsp.1995, Anderson i wsp.1998, Tretter i Adam-Vizi 2000). Uzyskanie w naszych badaniach wysoce znamiennej odwrotnej korelacji pomiędzy akumulacją azotynów przez komórki N9 a aktywnością akonitazy (r=0.887, p=0.0015) potwierdzałoby tezę udziału NO w mechanizmie inhibicji tego enzymu (Ryc.16 C) oraz zwiększaniu śmiertelności tych komórek (Ryc.34).

KGDHC okazała się być enzymem metabolizmu energetycznego najsilniej hamowanym przez LPS ([IC₅₀] = 0.041 µg/mL) (Ryc. 9A B). Nieco słabszą bo tylko 20 % inhibicję obserwowali inni badacze poddając hodowle mikrogleju działaniu

LPS 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ również przez okres jednej doby (Park i wsp.1999). Jednocześnie badacze ci po zastosowaniu kompetencyjnego inhibitora syntazy NO jakim jest L-NAME (ester metylowy N-nitro L-argininy) uzyskiwali zahamowanie inhibicji tego enzymu. Sugeruje to, że inhibicja KGDHC jest przynajmniej częściowo mediowana NO/ONNO- (Park i wsp.1999). Również nasze wcześniejsze badania z użyciem nitroprusydku sodu jako generatora NO, wykazywały inhibicję aktywności KGDHC w linii komórek cholinergicznym SN56 i odwracanie tej inhibicji przez kwas liponowy (Bielarczyk i wsp. 2006). Wskazuje to, że punktem uchwytym dla reaktywnych form azotu są wiążące liponian grupy sulfhydrylowe podjednostki E2 kompleksu KGDHC. Te grupy funkcyjne mają krytyczne znaczenie dla aktywności katalitycznej enzymu (Tretter i Vizi 2005, Park i wsp. 1999). Wiadomo również, że ONNO⁻ może indukować nitrowanie dwóch reszt tyrozynowych w podjednostkach E1 oraz E3 oraz jednej reszty tyrozynowej w podjednostce E2 kompleksu KGDH doprowadzając do jego inhibicji (Shi i wsp. 2010). Chinopoulos i jego współpracownicy (1999) dowiedli, że neuronalna KGDHC w izolowanych zakończeniach nerwowych jest również wrażliwa na H₂O₂. Z kolei badania na komórkach serca szczura wykazały, że do inhibicji KGDHC może dochodzić również pod wpływem produktów peroksydacji lipidów, które m.in. uszkadzają kowalencyjne wiązanie kwasu liponowego z podjednostką E2 enzymu (Humphries i Szweda 1998). O wielopunktowym działaniu rodników nitrozulowych na KGDHC świadczy fakt, że liponian nie odwracał całkowicie inhibicji tego enzymu przez NO (Bielarczyk i wsp.2006).

Hipotezę, że KGDH może być kluczowym etapem kaskady zdarzeń prowadzących do śmierci komórek w mózgu potwierdzili Heroux i Butterworth (1995) na szczurzym modelu niedoboru pirofosforanu tiaminy. Redukcja aktywności tego enzymu następowała bowiem na długo przed pojawieniem się zmian histopatologicznych w rejonach mózgu dotkniętych zaburzeniem.

Na udział NO i jego pochodnych w inhibicji KGDHC wskazuje wykazana przez nas silna odwrotna korelacja pomiędzy akumulacją azotynów a aktywnością KGDHC w komórkach mikroglejowych, w obecności różnych stężeń LPS ($r=0.944$, $p=0.0003$), (Ryc.16 D). Z drugiej strony nasze ostatnie badania wskazują, że inhibicyjne modyfikacje reszt sulfhydrylowych KGDHC i PDHC mogą być odwracane. Wynika z nich, że inhibicja KGDHC i PDHC przez SNP i Zn może być nawet po 24

godzinach odwracana przez kwas liponowy (Ronowska i wsp.2010, Bielarczyk i wsp.2006). Nasze wyniki uzupełniają również ostatnie doniesienia wykazujące, że związek redukujący jakim jest glutation może odwracać inhibicję KGDHC wywołaną nitrozylacją jej reszt tyrozynowych (Shi i wsp. 2011).

6.2.3. Wpływ LPS na metabolizm acetylo-CoA w mikrogleju N9.

W warunkach fizjologicznych w mózgu reakcja katalizowana przez PDHC jest niemal wyłącznym źródłem acetylo-CoA. Natomiast akonitaza i KGDHC katalizują jego zużycie w cyklu kwasów trójkarboksylowych. Jak dotąd nikt nie podejmował prób bezpośredniej oceny metabolizmu acetylo-CoA w komórkach mikroglejowych. Wykazana w tej pracy inhibicja PDHC przez LPS tłumaczyłaby więc obniżenie całkowitego poziomu acetylo-CoA w komórkach mikroglejowych (Ryc.6, 12A). Z kolei inhibicja akonitazy i KGDHC przez LPS (Ryc.7, 9) powodowałaby zmniejszone zużycie acetylo-CoA w cyklu kwasów trójkarboksylowych, na co wskazuje obniżony poziom ATP (Ryc.13). Utrzymanie stężenia acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym na tym samym poziomie pomimo obniżonej aktywności PDHC można więc wytłumaczyć jednoczesną silną inhibicją KGDHC ($IC_{50} = 0.041 \mu\text{g}/\text{Ml}$) i kilkakrotnie słabszą akonitazy ($IC_{50} = 0.239 \mu\text{g}/\text{Ml}$) (Ryc.6, 9, 29A). Inhibicja aktywności tych enzymów poprzez zahamowanie przepływu metabolicznego reszt acetylowych przez cykl kwasów trójkarboksylowych ograniczałaby sprzężoną z nim produkcję energii w łańcuchu oddechowym (Ryc.13). Dlatego też spadek produkcji acetylo-CoA należy uznać za kluczowy punkt mechanizmu zwiększonej śmiertelności komórek mikroglejowych w warunkach pobudzenia przez LPS (Ryc.4).

Drugim czynnikiem, którego związek przyczynowy ze spadkiem produkcji acetylo-CoA jest wyraźny to aktywacja mikrogleju. Niewątpliwie wzrost syntezy NO oraz cytokin w tych warunkach wymaga wydatków energetycznych, które nie są bilansowane w związku z jednoczesną zmniejszoną syntezą acetylo-CoA (Ryc.12, 15, 17). Z drugiej strony stabilny poziom acetylo-CoA w komórkach neuronalnych SN56 eksponowanych na LPS tłumaczyłby ich niewrażliwość na ten czynnik cytotoksyczny (Tabela 3). Jednocześnie sygnały różnicujące neurony, stymulujące drogi cAMP/CREB obniżałyby zawartość acetylo-CoA w neuronalnych mitochondriach (Bizon-Zygmańska i wsp.2011). To z kolei powodowałoby większą wrażliwość wysoko zróżnicowanych neuronów cholinergicznym na sygnały

neurodegeneracyjne (Szutowicz i wsp. 2006, Bielarczyk i wsp.2006, Szutowicz i wsp.2000). Tak więc, zarówno w przypadku mikrogleju jak i komórek neuronalnych obniżenie poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA byłoby uniwersalnym sygnałem powodującym ich zwiększoną śmiertelność (Ryc.30).

Stąd, wzrost śmiertelności mikrogleju do 20 % po jego aktywacji cAMP można tłumaczyć 50 % spadkiem poziomu acetylo-CoA (Ryc.21, 27, 28). Świadczy o tym również wysoce znamienna odwrotna korelacja między poziomem całkowitym acetylo-CoA a frakcją uszkodzonych komórek N9 ($r=0.748$, $p=0.006$) (Ryc.30). Należy przy tym podkreślić, że śmiertelność komórek nie zależała od rodzaju czynnika wywołującego obniżenie acetylo-CoA. Wskazuje to, że acetylo-CoA może być centralnym punktem decydującym o przeżyciu i aktywacji komórek mikroglejowych w różnych warunkach fizjologicznych i patologicznych.

6.2.4. Wpływ LPS na poziom ATP.

Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia wykazały, że 24 godzinna inkubacja komórek mikroglejowych w środowisku zawierającym LPS już od stężenia 0.05 $\mu\text{g/mL}$ doprowadzała do spadku poziomu wewnątrzkomórkowego ATP do 59.3 % wartości wyjściowej (Ryc.13). Dane te są zgodne z wynikami innych autorów. Chénais i wsp. (2002) stymulując mikroglej *in vitro* przez 16 godzin 0.05 $\mu\text{g/mL}$ LPS i 20U/mL IFN γ uzyskali spadek wewnątrzkomórkowego ATP do 67% przy niezmienionej aktywności ATPazowej. Zaobserwowali oni jednocześnie inhibicję kompleksu I i II łańcucha oddechowego. Obniżony poziom ATP powracał przy tym do wartości kontrolnych w próbach, do których dodawano inhibitor NOS (2mM L-NMMA). Potwierdza to hipotezę o negatywnym wpływie NO i jego pochodnych na metabolizm energetyczny komórek mikroglejowych. Obserwowany w naszych doświadczeniach wzrost syntezy NO po dodaniu LPS, również może być przyczyną spadku poziomu ATP wynikającego z inhibicji KGDHC i PDHC (Ryc.6, 9, 13).

Stres oksydacyjny wywoływany przez LPS powodowałby więc inhibicję KGDHC. To doprowadzałoby do spadku dostępności NAD(P)H dla kompleksu I. To z kolei skutkowałoby obniżeniem wydajności łańcucha oddechowego i inhibicją syntezy ATP. Taki mechanizm pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi, że we wczesnej fazie stresu oksydacyjnego zakończenia nerwowe z

obniżoną aktywnością KGDHC produkowały o 30 % mniej ATP (Tretter i wsp.1997).

Za istotną rolę ATP w modulacji śmiertelności mikrogleju i jego zależności od aktywności KGDHC przemawiają znamienne odwrotne korelacje między aktywnością KGDHC, a śmiertelnością komórek oraz między poziomem ATP, a śmiertelnością komórek (Ryc.11B, 14).

6.2.5. Wpływ LPS na funkcję (aktywność) mikrogleju.

Komórki mikroglejowe posiadają indukowalną syntazę tlenu azotu (iNOS), której ekspresja wzrasta podczas ich pobudzenia przez różne patogeny.

Nasze wyniki pozostają w zgodzie z obserwacjami innych autorów wskazującymi na zależny od stężenia LPS wzrost ekspresji genu iNOS oraz syntezy NO w komórkach mikroglejowych (Ryc.15). (Yoshioka i wsp. 2010, Lockhart i wsp. 1998). Wykazano również, że wzrost wydzielania NO nie jest procesem szybkim, bo następuje po kilku godzinach, a więc znacznie później niż wzrost wydzielania TNF- α , IL-1 β czy IL-6 (Nakamura i Kataoka 1999). Wynika to z faktu, że LPS stymuluje ekspresję genu iNOS z jednej strony na drodze aktywacji kinaz białkowych MAP (ERK1/2, JNK, p38), z drugiej poprzez czynnik transkrypcyjny NF- κ B (Lu i wsp. 2010).

Nasze badania wykazały po raz pierwszy, że komórki mikroglejowe, po zakończeniu ekspozycji na LPS, zachowały zdolność do zwiększonej syntezy NO, co najmniej przez okres 24 godzin (Tabela 2). Oznacza to, że aktywacja iNOS jest zjawiskiem utrwalonym powodującym adaptacyjne zmiany w komórkach mikroglejowych. Wskazuje na to wysoce znamienne odwrotna korelacja pomiędzy akumulacją azotynów, a aktywnością PDHC, akonitazy i KGDHC (Ryc.16 B, C, D). Potwierdza to hipotezę o udziale reaktywnych form azotu w upośledzeniu metabolizmu energetycznego komórek mikroglejowych w warunkach cytotoksycznych.

TNF- α oraz IL-6 są prozapalnymi cytokinami produkowanymi w OUN między innymi przez mikroglej i uważa się je za czuły i specyficzny wskaźnik aktywacji tych komórek (Lee i wsp. 2002; Pan i wsp.1997).

Wzrost poziomu transkryptu TNF- α oraz ilości wydzielonego przez mikroglej TNF- α po stymulacji LPS wykazano w wielu badaniach *in vitro* udowadniając jednocześnie udział w tym procesie kinaz białkowych MAP (ERK1/2, p38, JNK) oraz NF- κ B (McKimmie i Fazakerley 2005, Woo i wsp.2003, Liu i wsp. 2001, McKimmie i wsp. 2006, Lu i wsp. 2010). Pozostaje to w zgodzie z naszymi wynikami wykazującymi,

że 24 godzinna ekspozycja komórek mikroglejowych na LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$) powodowała 20-krotny wzrost wydzielania przez nie TNF- α (Ryc.17 B).

Wykazaliśmy także, że LPS stymuluje wydzielanie IL-6 przez komórki mikroglejowe (Ryc.17A) co znajduje potwierdzenie w licznych danych literaturowych (Lu i wsp. 2010, McKimmie i Fazakerley 2005, Godbout i wsp. 2004).

Uzyskane przez nas wyniki świadczą o tym, że linia N9 mikrogleju ma zdolność aktywacji pod wpływem LPS i dlatego stanowi dobry i wygodny model doświadczalny do badań funkcji i metabolizmu energetycznego tych komórek w OUN, w warunkach *in vitro*.

Waga poszczególnych czynników (NO, IL-6, TNF- α) w zjawisku wzrostu śmiertelności komórek N9 jest trudna do oszacowania. Jednakże brak korelacji pomiędzy szybkością syntezy badanych cytokin, a uszkodzeniem komórek (Ryc.37C, D) oraz całkowitym poziomem acetylo-CoA (Ryc. 37E, F) wskazują, że mogą one nie mieć istotnego związku z tymi zjawiskami.

6.3. Wpływ kwasu retinowego na komórki mikroglejowe N9

Kwas retinowy jest ważnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem informacji zarówno w komórkach neuronalnych jak i glejowych (Maden 2002, Takahashi i wsp. 1999, Dhen i wsp. 2004). Za pośrednictwem specyficznych jądrowych receptorów retinoidowych (RAR α,β,γ , RXR α,β,γ) wykazuje on działanie różnicujące na wiele grup komórek neuronalnych i glejowych (Maden 2002, Szutowicz i wsp. 1999, Allenby i wsp. 1993, Blusztajn i wsp.1992).

Uważa się, że RA może hamować neurotoksyczność aktywowanego mikrogleju poprzez supresję produkcji cytokin zapalnych i cytotoksycznych związków przez te komórki (Dheen i wsp.2004). Ochronne działanie RA wynikać ma z jego wpływu na wzrost ekspresji RAR β oraz inhibicję NF- $\kappa\beta$ (Xie i wsp.1993, Combs i wsp. 2001).

W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że RA 1 $\mu\text{M/L}$ obniżał ekspresję mRNA dla TNF- α oraz produkcję i wydzielanie TNF- α po stymulacji 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS. Spadała też ekspresja dla iNOS, a co za tym idzie synteza NO (Dheen i wsp. 2004). Pozostaje to w zgodzie z naszymi wynikami które wykazywały, że 1.0 $\mu\text{mol/L}$ RA zmniejszał wydzielanie azotynów, IL-6 oraz TNF α przez komórki mikroglejowe aktywowane 0.01 $\mu\text{g/mL}$ LPS odpowiednio o 60, 70 i 65 % (Ryc.33, 35, 36).

Uważa się, że RA powoduje inhibicję proliferacji komórek. Jednak w naszych doświadczeniach 1.0 $\mu\text{mol/L}$ stężenie RA nie wywierało takiego efektu na komórki N9 (Ryc.22). Sam RA nie wpływał ani na morfologię komórek ani na wydzielanie azotynów, TNF- α czy Il-6 przez komórki N9 (Ryc.20, 33, 35, 36). Uzyskano natomiast spadek aktywności KGDHC rzędu 39% (Ryc.26.) oraz wzrost poziomu acetylo-CoA o 42.8% w stosunku do kontroli (Ryc.28). Zjawisko to można wyjaśnić zmniejszonym zużyciem acetylo-CoA w cyklu kwasów trójkarboksylowych przy nie zmienionej aktywności PDHC (Ryc.23). Z drugiej jednak strony poziom ATP nie ulegał istotnym zmianom co można tłumaczyć zmniejszeniem przez RA stopnia aktywacji komórek N9 (Ryc.31). Jest to szczególnie widoczne w komórkach zaktywowanych cAMP, w których RA podnosił poziom acetylo-CoA, poziom ATP, zmniejszając jednocześnie ich śmiertelność (Ryc.21, 28, 31). Jednakże jednocześnie obniżał ich aktywność (Ryc.35, 36). Pozostaje do ustalenia w jakich warunkach patologicznych w mózgu *in vivo* sygnał RA może odgrywać tą pozytywnie modulującą rolę w reakcjach zapalnych. Nasze wyniki wskazują, że działanie to polegałoby na zmniejszeniu siły reakcji zapalnych przy jednoczesnym wzroście komórkowych zasobów acetylo-CoA i ATP, stabilizujących mikroglej (Ryc. 28, 31, 35, 36).

Interesującym faktem jest to, że te pozytywne skutki miały miejsce pomimo zachowania niskich aktywności akonitazy oraz poziomu ATP w komórkach aktywowanych cAMP i/lub LPS (Ryc.24, 31). Może to wskazywać, że akonitaza nie jest enzymem ograniczającym przepływ metaboliczny w cyklu kwasów trójkarboksylowych oraz, że stopień zmniejszenia jej aktywności przez LPS może nie mieć istotnego znaczenia w regulacji funkcji i żywotności mikrogleju. (Ryc.7).

6.4. Wpływ cAMP na komórki N9

Użyty w przedstawionej pracy egzogeny cAMP ma stymulować warunki *in vivo*, do których może dochodzić po aktywacji w mikrogleju cykazy adenylationowej. Cykliczny AMP jest wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem sygnału regulującym ekspresję genów za pośrednictwem czynnika CREB (Nowak 2004). Wiadomo, że wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP w komórkach mikroglejowych może nastąpić w wyniku działania na nie: noradrenaliny i innych agonistów β_1 i β_2 adrenergicznych, a także prostaglandyn (PGE_2), adenozyliny, gangliozydów, kortykotropiny, NGF czy plazminogenu (Zhang i wsp. 2002, Min i wsp. 2004,

Landsberg i Jastorff 1986). Wiadomo również, że w uszkodzeniach mózgu wzrastają poziomy PGE₂, adenozyiny oraz gangliozydów w mózgu (Pyo i wsp.1999, Min i wsp. 2004).

Wielu autorów sugeruje, że wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP hamuje aktywację komórek mikroglejowych oraz ich proliferację (Mori i wsp.2002, Zhang i wsp. 2002). Również hamuje produkcję i ekspresji związków potencjalnie neurotoksycznych oraz promujących zapalenie i odpowiedź immunologiczną takich jak: Il-12, NO, Il-1β, TNF-α, chemokin i MHC. Z drugiej strony w zaktywowanym mikrogleju cAMP podnosić ma produkcję i ekspresję związków potencjalnie neuroprotekcyjnych albo immunosupresyjnych: Il-10, PGE₂ (Patrizio 2004). Wyniki te są nie zgodne z ostatnimi doniesieniami wykazującymi aktywację mikrogleju przez różne ligandy, których wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem jest cAMP (Schlachetzki i wsp. 2010).

Nasze doświadczenia również wykazały, że istotnie czynnik ten podnosił niektóre parametry związane z aktywacją mikrogleju w postaci wzrostu produkcji i wydzielania NO (Ryc.33). Co więcej aktywacja ta stwarzała dobre podłoże do dalszej aktywacji przez egzogenne czynniki prozapalne. Dowodem na to jest dalszy wzrost wydzielania interleukin w obecności cAMP przez dodanie LPS (Ryc.35, 36). Nie potwierdzają one jednak doniesień o hamującym wpływie cAMP na aktywację komórek mikroglejowych. W naszych doświadczeniach cAMP powodował wzrost frakcji uszkodzonych komórek mikroglejowych (Ryc.21). Dochodziło również do zależnego od stężenia cAMP spadku całkowitej liczby tych komórek (Ryc.18), co więcej morfologia komórek traktowanych 0.25 mM cAMP odpowiadała morfologii komórek po ekspozycji na LPS (Ryc.5, 20). Wykazaliśmy także, po raz pierwszy, że cAMP nie wpływał na aktywność PDHC, akonitazy, IDH-NADP zależnej oraz KGDHC (Ryc.23-26). Ta pozorną niezgodność wskazuje na możliwość hamowania aktywności tych enzymów *in situ* przez czynniki, których działanie ustawało po homogenizacji komórek przed ich pobraniem do oznaczania aktywności enzymów. Tłumaczyłoby to zróżnicowanie reakcji różnych typów komórek glejowych i neuronalnych na te same lub podobne bodźce neurodegeneracyjne w mózgu *in vivo*. Jest to więc inny mechanizm niż ten, który ma miejsce w komórkach neuronalnych, w których dochodzi do adaptacyjnego obniżenia PDHC pod wpływem cAMP (Bielarczyk i wsp. 2003).

Nukleotyd ten nie modyfikował również hamującego wpływu LPS oraz RA na aktywność tych enzymów (Ryc. 23-26). Pod wpływem cAMP dochodziło natomiast do spadku całkowitego poziomu acetylo-CoA, jego frakcji mitochondrialnej oraz całkowitego poziomu ATP (Ryc.28, 29, 31).

Istnieją rozbieżności między różnymi badaniami dotyczącymi wpływu cAMP na aktywność iNOS oraz syntezę NO w obecności LPS. Nasze badania wykazujące wzrost wydzielania azotynów pod wpływem 0.25 mM cAMP potwierdzają wyniki Pyo i wsp. (1999), którzy stosowali 0.1 mM stężenie tego nukleotydu. Z kolei Minghetti i wsp. (1997) używający 10 razy niższych stężeń wykazali brak jego wpływu na ten parametr. Część badaczy wykazuje, że cAMP hamował ekspresję iNOS oraz wydzielanie NO przez komórki mikroglejowe aktywowane przez LPS (Zhang i wsp. 2002, Minghetti i wsp.1997, Min i wsp. 2004). Natomiast inni nie wykazywali wpływu cAMP na iNOS oraz wydzielanie NO w podobnych warunkach (Woo i wsp.2004, Nakamura i Kataoka 1999). Nasze badania nie potwierdzają żadnego z tych wyników. Dodanie do hodowli 0.25 mM cAMP, a następnie LPS powodowało synergistyczny wzrost wydzielania NO mierzony akumulacją azotynów przez mikroglej (Ryc.33). Być może rozbieżności te wynikają z szerokiego zakresu stężeń cAMP użytych przez tych autorów. Z drugiej strony są one zgodne z najnowszymi doniesieniami wykazującymi aktywację mikrogleju przez związki sygnałowe zwiększające poziom cAMP w komórkach (Schlachetzki i wsp. 2010) Badania wielu autorów wykazały, że cAMP powoduje spadek ekspresji mRNA oraz szybkość wydzielania TNF- α przez komórki mikroglejowe aktywowane LPS (Woo i wsp.2004, Nakamura i Kataoka 1999, Zhang i wsp. 2002). Pozostaje to jednak w sprzeczności z naszymi wynikami według których sam cAMP nie wpływał na wydzielanie TNF- α . Co więcej obecność LPS była niezbędna do ujawnienia aktywującego działania cAMP (52% wzrost) (Ryc.36). Z drugiej strony nie wykazaliśmy wpływu cAMP na wydzielanie Il-6 przez komórki stymulowane lub nie przez LPS, co pozostaje w zgodzie z danymi innych autorów (Ryc.35) (Nakamura i Kataoka 1999, Woo i wsp. 2004). Nasze dane nie dają podstaw do wyjaśnienia tych rozbieżności.

6.5. Wpływ LPS na neurony cholinergiczne SN56

Uważa się, że neurotoksyczność wielu patogenów wynika nie z bezpośredniego ich działania na neurony lecz z aktywacji mikrogleju. Dlatego wzrost

syntezy NO, pochodnych rodników nitrozylowych oraz cytokin przez pobudzony patogenem mikroglej uważany jest za czynnik powodujący śmierć neuronów w różnych zespołach neurodegeneracyjnych. Wskazuje na to fakt, że mikroglej wykazuje wysoką ekspresję receptora TLR4, którego podstawowym ligandem jest LPS (Lehnardt 2010, Lehnardt i wsp.2003). Wykazano wprawdzie, że na powierzchni neuronów kory mózgu znajdują się TLR2, TLR3 oraz TLR11-13, lecz brak jest ekspresji przez te komórki TLR4 oraz CD14 (Mishra i wsp. 2008, Lehnardt i wsp. 2003). Wyjaśnia to wyniki innych badań *in vitro* wykazujących, że LPS nie wpływał na przeżywalność neuronów korowych w nieobecności mikrogleju, powodował natomiast znaczną śmiertelność komórek neuronalnych w hodowli mieszanej neuronalno-mikroglejowej (Lehnardt i wsp. 2003). Weis i Humpel (2002) badając *in vitro* zarówno ostry jak i przewlekły wpływ LPS na cholinergiczne komórki przedomózgowia nie wykazali zmian w przeżywalności tych komórek pod wpływem LPS. Autorzy ci przypuszczają, że śmierć neuronów przedomózgowia pod wpływem LPS wymaga obecności komórek mikro i astroglejowych. Potwierdziły to doświadczenia na hodowlach mieszanych, w których LPS powodował spadek liczby neuronów cholinergicznych przedomózgowia oraz obniżenie aktywności ChAT na drodze wzrostu syntezy NO w komórkach mikroglejowych. Zastosowanie bowiem inhibitora NOS chroniło te komórki przed LPS (McMillian i wsp. 1995). Wszystko to tłumaczy więc nasze wyniki, nie wykazujące żadnego istotnego wpływu LPS na przeżywalność, wzrost oraz badane przez nas parametry metabolizmu energetycznego neuronów cholinergicznych SN56 (Tabela 3).

Tabela 4. Wpływ różnych czynników różnicujących na parametry metaboliczne i enzymatyczne mikroglejowych komórek N9 oraz cholinergicznym komórek neuronalnych SN56

Parametr	Czynnik modyfikujący	Mikroglej N9	Komórki cholinergiczne SN56
Acetylo-CoA poziom całkowity (wartość względna)	kontrola	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
	LPS	0.8 ± 0.05	0.9 ± 0.02
	RA	1.4 ± 0.1	-
	cAMP	0.5 ± 0.04	-
	RA+cAMP	1.0 ± 0.04	0.9 ± 0.01
	RA+cAMP+LPS	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.04
PDHC (wartość względna)	kontrola	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
	LPS	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.05
	RA	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.07 *
	cAMP	0.9 ± 0.08	0.7 ± 0.05 *
	RA+cAMP	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.05
	RA+cAMP+LPS	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.04
KGDHC (wartość względna)	kontrola	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.02
	LPS	0.4 ± 0.06	0.9 ± 0.05
	RA	0.6 ± 0.06	-
	cAMP	0.3 ± 0.06	-
	RA+cAMP	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.07
	RA+cAMP+LPS	0.2 ± 0.06	0.5 ± 0.04
Śmiertelność (wartość względna)	kontrola	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
	LPS	2.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2
	RA	0.4 ± 0.1	-
	cAMP	9.5 ± 1.5	-
	RA+cAMP	2.5 ± 0.3	1.6 ± 0.2
	RA+cAMP+LPS	4.0 ± 0.4	1.2 ± 0.3

Czynniki użyto w następujących stężeniach: LPS: 0.01µg/ml w kom. N9, 1.0 µg/ml w kom. SN56; RA:0.01mM; cAMP:0.25 mM w kom. N9; 1.0 mM w kom.SN56 . Cyfry są wartościami względnymi. *Szutowicz i wsp.1999

6.6. Wpływ cAMP i RA na neurony cholinergiczne SN56

Uważa się, że sygnalizacja wewnątrzkomórkowa mediowana przez cAMP, RA w znacznym stopniu modyfikuje ekspresję fenotypu neuroprzekaźniczego neuronów cholinergicznym i jak również innych układów neuroprzekaźnikowych. Geny dla ChAT i VAcHT tworzą locus cholinergicznym, którego regulacja zależy właśnie od aktywowania przez cAMP czynników transkrypcyjnych CREB (Blusztajn i wsp. 1992).

Nasze poprzednie badania wykazały, że różnicowanie cholinergicznym neuronalnym komórek przegrody mózgu myszy przez cAMP, RA lub NGF

zmieniało ich wrażliwość na szereg neurotoksyn takich jak NO, Zn, Al, amyloid- β , oraz niedobór pirofosforanu tiaminy (Bizon-Zygmańska i wsp. 2011, Ronowska i wsp. 2010, Bielarczyk i wsp. 2006). Brak wpływu LPS zarówno na zróżnicowane jak i niezróżnicowane neurony cholinergiczne wskazuje, że niewrażliwość na ten czynnik neurotoksyczny nie jest związana ze zmianami ich fenotypu neuroprzekazniczego, a z brakiem receptora TLR4 (Tab.3). Wskazuje natomiast, że może to być wpływ pośredni wynikający z nadprodukcji NO przez mikroglej pobudzony *in vivo* LPS.

Nasza hipoteza jest zgodna z poprzednimi obserwacjami wykazującymi, że IL-1 β i IL-6 powodowały wzrost śmiertelności i supresję fenotypu cholinergicznego w neuronalnych komórkach SN56 (Bielarczyk i wsp. 2005). Podobnie nadmiar NO pochodzący z pobudzonego mikrogleju może uszkadzać neurony cholinergiczne poprzez zahamowanie syntezy acetylo-CoA przez PDHC i inhibicję jego zużycia do produkcji energii w mitochondriach i syntezy acetylocholin w cytoplazmie (Bielarczyk 2003a).

Przeprowadzone w tej pracy badania porównujące metabolizmu acetylo-CoA w mikrogleju i neuronalnych komórkach cholinergicznym stanowią pierwszą w literaturze światowej próbę określenia kompartmentacji metabolizmu energetycznego w różnych rodzajach komórek mózgu i ich korelacji ze zmianami funkcji i przeżywalności w warunkach neurotoksycznych. (Tabela 3). Wskazują one, że chociaż mikroglej i neurony cholinergiczne mają zróżnicowaną wrażliwość na różne czynniki neurotoksyczne, to uniwersalnym sygnałem powodującym ich uszkodzenie lub śmierć jest obniżenie ich komórkowych zasobów acetylo-CoA.

7. WNIOSKI

Przedstawione dane pozwalają na postawienie hipotezy dotyczącej cytotoksycznego działania LPS poprzez jego interakcję z syntezą i metabolizmem acetylo-CoA w komórkach mikroglejowych.

1. Inhibicja PDHC, akonitazy i KGDHC przez LPS może być ściśle związana ze zwiększoną produkcją i cytotoksycznym działaniem NO na zaktywowane komórki mikroglejowe.
2. Długotrwała inhibicja tych enzymów przez LPS zmniejsza syntezę acetylo-CoA i jego zużycie w cyklu kwasów trójkarboksylowych.
3. Stabilny poziom mitochondrialnego acetylo-CoA w komórkach mikroglejowych traktowanych LPS może wynikać z jednoczesnej inhibicji jego syntezy przez PDHC i jego zużycia przez akonitazę i KGDHC.
4. Inhibicja zużycia acetylo-CoA w cyklu kwasów trójkarboksylowych przez LPS powoduje obniżenie poziomu ATP i zwiększoną śmiertelność komórek mikroglejowych.
5. Ochronne działanie kwasu retinowego na komórki mikroglejowe może wynikać z jego zdolności do zmniejszania siły reakcji zapalnych przy jednoczesnym wzroście komórkowych zasobów acetylo-CoA i ATP.
6. Związki sygnałowe zwiększające komórkowy poziom cAMP wywierają aktywujący wpływ na komórki mikroglejowe.
7. Neurotoksyczność LPS wobec cholinergicznych komórek neuronalnych wydaje się wynikać nie z jego bezpośredniego działania na te komórki, ale z aktywacji mikrogleju.
8. Znaczne różnice w dystrybucji wewnątrzkomórkowej acetylo-CoA w mikrogleju i neuronach cholinergicznych wskazują na konieczność uwzględniania specyficznych cech międzykomórkowej kompartmentacji tego metabolitu w badaniach mechanizmów zaburzeń metabolizmu energetycznego w różnych encefalopatiach.

8. BIBLIOGRAFIA

Aaron AH, Yelenis H, Craig TA, Javier C, Keith RP. Sigma receptors suppress multiple aspects of microglial activation. *Glia* 2009;57:744-754

Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo JF, Chambon P. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90:30-34

Anderson U, Leighton B, Young ME, Blomstrand E, Newsholme EA. Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249:512-516

Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Philips J, Lanier L, Somoza C. B7 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993; 366:76-79

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;109:33-44

Bal-Price A, Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia, inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 2001;21:6480-6491

Bal-Price A, Brown GC. Stimulation of the NADPH oxidase in activated rat microglia removes nitric oxide but induces peroxynitrite production. *J Neurochem.* 2002;80:73-80

Banati RB, Egensperger R, Maassen A, Hager G, Kreutzberg GW, Graeber MB. Mitochondria in activated microglia in vitro. *J Neurocytol.* 2004;33:535-541

Barnum SR. Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease. *Mol Med.* 1999;5:569-582

Bereiter-Hahn J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol.* 1990;122:1-63

Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 2007;55:233-238

Bielarczyk H, Tomaszewicz M, Madziar B, Cwikowska J, Pawełczyk T, Szutowicz A. Relationships between cholinergic phenotype and acetyl-CoA level in hybrid murine neuroblastoma cells of septal origin. *J Neurosci Res.* 2003;73: 717-721

Bielarczyk H., Jankowska A., Madziar B., Matecki A., Michno A., Szutowicz A.: Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid β -peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem. Int.* 2003a;42:1-9

Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Gul S, Pawełczyk T, Szutowicz A. Phenotype dependent differential effects of interleukin-1 β and amyloid- β on viability and cholinergic phenotype of T17 neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 2005;47:466-473

Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Bizon-Zygmanska D, Pawełczyk T, Szutowicz A. RS-alpha-lipoic acid protects cholinergic cells against sodium nitroprusside and amyloid-beta neurotoxicity through restoration of acetyl-CoA level. *J Neurochem.* 2006;98:1242-51

Bizon-Zygmańska D, Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Ronowska A, Marszał M, Szutowicz A. Acetyl-CoA metabolism in amprolium-evoked thiamine pyrophosphate deficits in cholinergic SN56 neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 2011;59:208-216

Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 2005;76:77-98

Block ML, Li G, Qin L, Wu X, Pei Z, Wang T, Wilson B, Yang J, Hong JS. Potent regulation of microglia-derived oxidative stress and dopaminergic neuron survival: substance P vs. dynorphin. *FASEB J.* 2006; 20:251-258

Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanism. *Nature Rev.* 2007; 8:57-69

Blusztajn JK, Venturini A, Jackson DA, Lee HJ, Wainer BH. Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. *J Neurosci.* 1992; 12: 793-9.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

Brockhaus J, Moller T, Kettenmann H. Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia* 1996;16:81-90

Brosnan CF, Battistini L, Raine CS, Dickson DW, Casadevall A, Lee SC. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Dev Neurosci.* 1994;16:152-161

Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 1994;356:295-298

Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanism of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol.* 2010;41:242-247

Butler M. Cell counting and viability measurements. *Methods of Biotechnology.*, Jenkins N., Humana Press, USA, 1989, 8.

- Calingasan NY, Baker H, Sheu KFR, Gibson GE. Distribution of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex in rat brain. *J Comp Neurol.* 1994;346:461-480
- Calvo CF, Dobbertin A, Gelman M, Glowinski J, Mallat M. Identification of CSF-1 as a brain macrophage migratory activity produced by astrocytes. *Glia.* 1998;24:180-186
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia-New concepts. *Brain Res. Rev.* 2007; 53:344-354
- Chan EC, Jiang F, Peshavariya HM, Dusting GJ. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signalin: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther.* 2009;122: 97-108
- Chang RCC, chen W, hudson P, Wilson B, Han DSK, Hong JS. Neurons reduce glial responses to lipopolysaccharide (LPS) and prevent injury of microglial cells from over-activation by LPS. *J Neurochem.* 2001;76:1042-1049
- Chao CC, Hu S, Peterson PK. Modulation of human microglial cell superoxide production by cytokines. *J Leukoc Biol.* 1995;58:65-70
- Chénais B, Morjani H, Drapier JC. Impact of endogenous nitric oxide on microglial cell energy metabolism and labile iron pool. *J Neurochem.* 2002;8:615-623
- Cheng B, Christakos S, Mattson MP. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron.*1994;12:139-153
- Chew LJ, Takanohashi A, Bell M. Microglia and inflammation: impact on developmental brain injuries. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2006; 12:105-112
- Cho S, Park EM, Zhou P, Frys K, Ross ME, Iadecola C. Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *J cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:493-501
- Choi SH, Lee DY, Chung ES, Hong YB, Kim SU, Jin BK. Inhibition of thrombin-induced microglial activation and NADPH oxidase by minocycline protects dopaminergic neurons in the substantia nigra in vivo. *J Neurochem.* 2005;95:1755-1765
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. Beta-amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2001;21:1179-1188
- Dame JB, Christensen RD, Juul SE. The distribution of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the developing human fetus. *Pediatr. Res.* 1999;46:358-366

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8:752-758

De Villafranca GW, Haines VE. Paramyosin from arthropod cross-striated muscle. *Comp Biochem Physiol B.* 1974; 47: 9-26.

Dheen ST, Jun Y, Yan Z, Tay SS, Ang Ling E. Retinoic acid inhibits expression of TNF- α and iNOS in activated rat microglia. *Glia* 2004; 50: 21-31

Dimayuga FO, Reed JL, Carnero GA, Wang C, Dimayuga ER, Dimayuga VM, Perger A, Wilson ME, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Estrogen and brain inflammation: Effect on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. *J Neuroimmunology* 2005;161:123-136

Ding L, Linsley P, Huang L, Germain R, Shevach E. Il-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the upregulation of B7 expression. *J Immunol.* 1993;151:1224-1234

Ding M, Pierre BA, Parkinson JF, Medberry P, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Merrill JE. Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia. *J Biol Chem.* 1997;272:11327-11335

Edwards YH, Chase JF, Edwards MR, Tubbs PK. Carnitine acetyltransferase: the question of multiple forms. *Eur J Biochem.* 1974;46:209-215

Elfering SL, Haynes VL, Traaseth NJ, Ettl A, Giulivi C. aspects, mechanism, and biological relevance of mitochondrial protein nitration sustained by mitochondrial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:22-9

Elkabes S, DiCiocco-Boom E, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci.* 1996;16:2508-2521

Farrar WI, Vinocour M, Hill JM. In situ hybridization histochemistry localization of interleukin-3 mRNA in mouse brain. *Blood.* 1989;73:137-140

Ferrari D, Villalba M, Chiozzi P, Falzoni S, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F. Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J Immunol.* 1996;156:1531-1539

Fonnum F. Radiochemical micro assays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Biochem J.* 1969;115: 465-72.

Frei K, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A. Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1986; 137:3521-3527

- Frigerio S, Silei V, Ciusani E, Massa G, Lauro GM, Salmaggi A. Modulation of fas-ligand (Fas-L) on human microglial cells: an in vitro study. *J Neuroimmunol* 2000;105:109-114
- Fujita H, Tanaka J, Toku K, Tateishi N, Suzuki Y, Matsuda S, Sakanaka M, Maeda N. Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. *Glia*.1996;18:269-281
- Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW. Superoxide radicals and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995;270:13399-13405
- Gibson G, Barclay L, Blass J. The role of the cholinergic system in thiamin deficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 1982; 378: 382-403.
- Giulian D, Baker TJ. Charakterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.*1986; 6:2163-2178
- Godbout JP, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. α -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *J Neuroimmunol.* 2004;149:101-109
- Golde S, Chandran S, Brown GC, Compston A. Different pathway for iNOS-mediated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expression. *J Neurochem.* 2002;82:268-282
- Gorman MW, Marble DR, Ogimoto K, Feigl EO. Measurement of adenine nucleotides in plasma. *Luminescence* 2003; 18: 173-181.
- Guyton KZ, Gorospe M, Kensler TW, Holbrook NJ. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: implications for cellular survival and tumor promotion. *Cancer Res.* 1996;56:3480-3485
- Hammond DN, Lee HJ, Tongsgard JH, Wainer BH. Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res.* 1990;512:190-200
- Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J Neurosci.* 2002;22:3921-3928
- Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; 10:1387-1394
- Hepner FI, Roth K, Nitsch R, Hailer NP. Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia*.1998;22:180-188
- Heroux M, Butterworth RF. Regional alteration of thiamine phosphate esters and od thiamine diphosphate-dependent enzymes in relation to function in experimental Wernicke's encephalopathy. *Neurochem* 1995;20:87-93.

Hess DC, Abe T, Hill WD. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp. Neurol.* 2004;186:134-144

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. Down-regulation of macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science.* 2000;290:1768-1771

Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Chao CC. Cytokine modulation of murine microglial cell superoxide production. *Glia* 1995;13:45-50

Hu S, Chao CC, Khanna KV, Gekker G, Peterson PK, Molitor TW. Cytokine and free radical production by porcine microglia. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1996, 78: 93-96

Humphries KM, Szweda LI. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 1998;37:15835-15841

Janabi N, Chabrier S, Tardieu M. Endogenous nitric oxide activates prostaglandin F2 alpha production in human microglial cells but not in astrocytes: a study of interactions between eicosanoids, nitric oxide, and superoxide anion (O₂⁻) regulatory pathways. *J Immunol.* 1996;157:2129-2135

Jankowska A, Madziar B, Tomaszewicz M, Szutowicz A. Acute and chronic effects of aluminium on acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in differentiated and nondifferentiated SN56 cholinergic cells. *J Neurosci Res.* 2000;62:615-622

Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawelczyk T, Wroblewska M, Szutowicz A. Acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminal compartment of thiamine deficient rat brain. *J Neurochem.* 2010; 115: 333-342

Jonakait GM, Wen Y, Wan Y, Ni L. Macrophage cell-conditioned medium promotes cholinergic differentiation of undifferentiated progenitors and synergizes with nerve growth factor action in the developing basal forebrain. *Exp Neurol.* 2000;161:285-296

Katoh Y, Niimi M, Yamamoto Y, Kawamura T, Morimoto-Ishizuka T, Sawada M, Takemori H, Yamatodani A. Histamine production by cultured microglial cells of the mouse. *Neurosci Lett.* 2001;305:181-184

Kiefer R, Lindholm D, Kreutzberg GW. Interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 mRNA are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur. J Neurosci.* 1993;5:775-781

Kim SU, Nagai A. Microglia as immune effectors of the central nervous system: Expression of cytokines and chemokines. *Clin. And Experimental Neuroimmunol.* 2010;1:61-69

- Kloss CUA, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G. Effect of lipopolysaccharide on morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurology* 2001;168:32-46
- Kohji T, Matsumoto Y. Coexpression of Fas/FasL and Bax on brain and infiltrating T cells in the central nervous system is closely associated with apoptotic cell death during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2000;106:165-171
- Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1997;94:11233-11237
- van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000;67:2-17
- Kraft AD, McPherson CA, Harry GJ. Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology* 2009; 30 : 785-793
- Kreutzberg GW. Microglia, a sensor of pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19:312-328
- van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Bruck W, Unterberg A, Buhner C, von Deimling A. Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia* 2001;35:167-179
- Landsberg CR, Jastorff B. The role of cAMP in nerve growth factor-promoted neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Biol.* 1986;102:821-829
- Lauber JK. Retinal pigment epithelium: ring mitochondria and lesions induced by continuous light. *Curr Eye Res.* 1982; 2:855-862
- Lee CS, Morgan G, Wooding FB. Mitochondria and mitochondria-tenofilament-desmosomal associations in the mammary gland secretory epithelium of lactating cows. *J Cell Science* 1979;38:125-135
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001;294:1945-1948
- Lee SJ, Lee S. Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Curr drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:181-191
- Lee YB, Nagi A, Kim SV. Cytokines, chemokines and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res.* 2002;69:94-103
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8514-8519
- Lehnardt S. Innate Immunity and Neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 2010;58:253-263

- Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and ameboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 1993;7:9-18
- Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem.* 2001;77:182-189
- Lockhart BP, Cressey KC, Lepagnol JM. Suppression of nitric oxide formation by tyrosine kinase inhibitors in murine N9 microglia. *Br J Pharmacol.* 1998;123:879-889
- Lopez-Redondo F, Nakajima K, Honda S, Kohsaka S. Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Brain Res Mol Brain Res.*2000;76:429-435.
- Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidant and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 2003;9:64-76
- Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 1999;9:119-131
- Ma TC, Zhu XZ. Neurotoxic effects of interleukin-6 and sodium nitroprusside on cultured rat hippocampal neurons. *Arzeimittelforschung* 2000;50:512-514
- Maden M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nature Rev.* 2002;3:843-853
- Mander P, Brown GC. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflamm.* 2005;2:20
- Mander PK, Jekabsone A, Brown GC. Microglia Proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol* 2006;176: 1046-1052.
- Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G. Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2005; 79:240-247
- Mayo L, Stein R. Characterization of LPS and interferon- γ triggered activation-induced cell death in N9 and primary microglial cells: induction of the mitochondrial gateway by nitric oxide. *Cell Death and Differentiation* 2007;14:183-195
- McDonald DR, Brunden KR, Landreth GE. Amyloid fibrils activate tyrosine kinase –dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci.* 1997;17:2284-2294
- McGeer PL, McGeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2002;26:459-470

McKimmie CS, Fazakerley JK. In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression. *J Neuroimmunol.* 2005;169:116-125

McKimmie CS, Roy D, Forster T, Fazakerley JK. Innate immune response gene expression profiles of N9 microglia are pathogen-type specific. *J Neuroimmunology* 2006;175:128-141

McMillan M, Kong LY, Sawin SM, Wilson B, Das K, Hudson P, Hong JS, Bing G. Selective killing of cholinergic neurons by microglial activation in basal forebrain mixed neuronal/glial cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:572-577

Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos LJr, Baron P, Villalba m, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 1995;374:647-650

Michnikawa M, Kikuchi S, Kim SU. Leukemia inhibitory factor (LIF) mediated increase of choline acetyltransferase activity in mouse spinal cord neurons in culture. *Neurosci Lett.* 1992;140:75-77

Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH. Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia.* 2004;48:197-206

Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Creminon C, Maclouf J, Levi G. Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E₂ and by cyclooxygenase inhibitors. *Glia* 1999;19:152-160

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple, spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2001;5:62-71

Mishra BB, Gundra UM, Taelle JM. Expressing and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 2008;5:53

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order magnitude. *Acta Neuropathol* 2001; 101:249-255

Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y, Kohsaka S. Lipopolysaccharide enhances synthesis of BDNF in cultured rat microglia. *J. Neurosci Res.* 1997;50:1023-1029

Mori K, Ozaki E, Zhang B, Yang L, Yokoyama A, Takeda I, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J. Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express α 1, α 2, β 1 and β 2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology* 2002;43:1026-1034

Moss DW, Bates TE. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon- γ causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur J Neurosci* 2001;13:529-538

Nagata K, Takei N, Nakajima K, Saito H, Kohsaka S. Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J Neurosci Res.* 1993;34:357-363

Nakajima K, Hamanoue M, Shimojo M, Takei N, Kohsaka S. Characterization of microglia isolated from a primary culture of embryonic rat brain by simplified method. *Biomed Res.* 1989;10:411-423

Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2004; 4:65-84

Nakamura Y, Si Q.S, Kataoka K. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res.*1999; 35: 95-100

Nakamura Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol. Pharm. Bull.* 2002; 25: 945-953

Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 2009; 132:288-295

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005;308:1314-1318

Nowak J. Cykliczny AMP:synteza, inaktywacja I mechanizmy działania w komórce. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Wydawnictwo PWN 2004:37-63

Pan W, Zadina JE, Harlan RE, Weber JT, Banks WA, Kastin A. Tumor necrosis factor- α : a neuromodulator in the CNS. *Neurosci Biobehav. Rev.* 1997;21:603-613

Park LCH, Zhang H, Sheu KFR, Calingasan NY, Kristal BS, Lindsay G, Gibson GE. Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia. *J Neurochem.* 1999;72:1948-1957

Patrizio M. Tumor necrosis factor reduces cAMP production in rat microglia *Glia* 2004;48:241-249

Pawelczyk T, Angielski S. Cooperation of Ca and pH in regulation of the activity of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and its components from bovine kidney cortex. *Acta Biochim Pol.* 1984; 3: 289-305.

Payne J, Maher F, Simpson I, Mattice L, Davies P. Glucose transporter glut 5 expression in microglial cells. *Glia* 1997;21:327-331

Pedersen WA, Berse B, Schüler U, Wainer BH, Blusztajn JK. All-trans-and 9-cis-retinoic acid enhance the cholinergic properties of a murine septal cell line: evidence that the effects are mediated by activation of retinoic acid receptor-alpha. *J Neurochem.* 1995; 65: 50-58

- Pender MP, Rist MJ. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* 2001;36:137-144
- Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, Hidalgo J. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 1999;25:343-357
- Peress NS, Fleit HB, Perillo E, Kuljis R, Pezzullo C. Identification of Fc gamma RI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia senile plaques in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* 1993;48:71-79
- Plaut GW, Aogaichi T. Purification and properties of diphosphopyridine nucleotide-linked isocitrate dehydrogenase of mammalian liver. *J Biol Chem.* 1968;243:5572-83.
- Polfliet MMJ, Zwijnenburg PJG, van Furth AM, van der Poll T, Dopp EA, de Lavalette CR, van Kesteren-Hendrikx EML, van Rooijen N, Dijkstra CD, van den Berg TK. Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J. Immunol.* 2001;167:4644-4650
- Priller J, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW. Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. *Glia.* 1995; 15:447-457
- Pyo H, Jou I, Jung S, Joe E. cAMP potentiates β -amyloid-induced nitric oxide release from microglia. *Neuroreport* 1999;10:37-40
- Qin L, Liu Y, Cooper C, Liu B, Wilson B, Hong JS. Microglia enhance β -amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem.* 2002;83:973-983
- Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem.* 2004;279:1415-1421
- Raivich G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci.* 2005;28:571-573
- Ravichandran KS. "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell* 2003;113:817-820
- Richards EM, Rosenthal RE, Kristian T, Fiskum G. Postischemic hyperoxia reduces hippocampal pyruvate dehydrogenase activity. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:1960-1970
- Richardson PJ. Quantitation of cholinergic synaptosomes from guinea pig brain. *J Neurochem.* 1981; 37: 258-60.

Righi M, Mori L, De Libergo G, Sironi M, Biondi A, Mantovani A, Dennis-Donini S, Castagnoli PR. Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol.* 1989; 19:1443-1448

Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. Role of Microglia in central nervous system infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004;17:942-964

Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J, Grover A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol.* 2007;82:235-46

Ronowska A. Zależna od fenotypu i genotypu podatność komórek cholinergicznyc na bodźce cytotoksyczne i cytoprotekcyjne. Praca doktorska 2008

Ronowska A, Dyś A, Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska-Łata J, Bielarczyk H, Romianowski P, Pawełczyk T, Szutowicz A. Short-term effects of zinc on acetylcholine metabolism and viability of SN56 cholinergic neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 2010;56:143-51.

Ronowska A, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, szutowicz A. Effects of zinc on SN56 cholinergic neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2007;103:972-83

Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, Bhide PG, Vonsattel JP, DiFiglia M. Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60:161-172

Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H, Marunouchi T. Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res.* 1990; 509: 119-124

Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol.* 2003;183:25-33

Schlachetzki JCM, Hüll M. Microglial activation in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Res.* 2009;6:554-563

Schlachetzki JCM, Fiebich BL, Haake E, Oliveira ACP, Candelario-Jalil E, Heneka MT, Hüll Michael. Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE₂ in primary rat microglia. *J Neuroinflamm.* 2010;11;7:2

Schobitz B, de Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 1993;5:1426-1435

Schofield E, Kersaitis C, Shepherd CE, Kril JJ, Holliday GM. Severity of gliosis in Pick's disease and frontotemporal lobar degeneration: τ -positive glia differentiate these disorders. *Brain* 2003;126:827-840

- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991;10:2247-2258
- Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol.* 1988;23:339-346
- Sendtner M, Arakawa Y, Stockli KA, Kreutzberg GW, Thoenen H. Effect of ciliary neurotropic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci.* 1991;15:1003-109
- Shi Q, Xu H, Haiqiang Y, Zhang N, Ye Y, Estevez AG, Deng H, Gibson GE. Inactivation and reactivation of the mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 2011;286:17640-8
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J cereb blood Flow Metab.* 2007;27:1766-1791
- Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res.* 1999;19:1-24
- Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.* 1999;9:69-92
- Srebro Z, Dziobek K. Neuroprotection: the role of neuroglia. *Folia Med Cracow.* 2001;42:113-121
- Stoll M, Capper D, Dietz K, Warth A, Schleich A, Schlaszus H, Meyermann R, Mittelbronn M. Differential microglial regulation in the human spinal cord under normal and pathological conditions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006;32:650-661
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology* 1999;57: 563-581
- Streit WJ, Hurley SD, McGraw TS, Semple-Rowland SI. Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J. Neurosci. Res.* 2000; 61:10-20
- Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J. Neuroimmunol.* 1990;30:111-120
- Szutowicz A, Angielski S. Regulation of ATP citrate lyase activity in vitro. *Acta Biochim Pol.* 1970; 17: 159-174.
- Szutowicz A, Łysiak W. Regional and subcellular distribution of ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain. *J Neurochem.* 1980;35:775-85

Szutowicz A, Stępień M, Piec G. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase activities using citrate synthase. *Anal Biochem.* 1981; 115: 81-87.

Szutowicz A, Stępień M, Bielarczyk H, Kabata J, Łysiak W. ATP citrate lyase in cholinergic nerve endings. *Neurochem. Res.* 1982;7:799-810

Szutowicz A, Bielarczyk H. Elimination of CoASH interference from acetyl-CoA cycling assay by maleic anhydride. *Anal Biochem.* 1987; 164: 292-296.

Szutowicz A, Tomaszewicz M, Bielarczyk H, Jankowska A. Putative significance of shifts in acetyl-CoA compartmentalization in nerve terminals for disturbances of cholinergic transmission in brain. *Dev Neurosci.* 1998; 20: 485-92.

Szutowicz A, Jankowska A, Blusztajn JK, Tomaszewicz M. Acetylcholine and acetyl-CoA metabolism in differentiating SN56 septal cell line. *J. Neurosci.Res.* 1999; 57:131-136

Szutowicz A, Tomaszewicz M, Jankowska A, Madziar B, Bielarczyk H. Acetyl-CoA metabolism in cholinergic neurons and their susceptibility to neurotoxic inputs. *Met Brain Dis.* 2000;15:29-44

Szutowicz A, Madziar B, Pawełczyk T, Tomaszewicz M, Bielarczyk H. Effects of NGF on acetylcholine, acetyl-CoA metabolism, and viability of differentiated and non-differentiated cholinergic neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2004;90:952-961

Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Pawełczyk T, Jankowska-Kulawy A. Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Metab Brain Dis.* 2006;21: 149-61.

Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol.* 1999;38: 65-81

Takeuchi H, Wang J, Kawanokuchi J, Norimasa M, Tetsuya M, Akio M. Interferon- γ induces microglial-activation-induced cell death: A hypothetical mechanism of relapse and remission in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2006; 22:33-39

Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *Journal of Leukocyte Biology* 2009; 85:352-369

Thomas EW. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res.Rev.*1999;31:42-57

Tokarz-Deptuła B, Niedźwiecka P, Deptuła W. Receptory Toll-podobne-nowe znaczniki w immunologii. *Alergia Astma Immunologia* 2006;11:23-28

Tonra JS, Reiseter BS, Kolbeck R, Nagashima K, Robertson R, Keyt B, Lindsay RM. Comparison of the timing of acute blood-brain barrier breakdown to rabbit

immunoglobulin G in the cerebellum and spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol.* 2001;430:131-144

Tretter L, Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Enhanced depolarization-evoked calcium signal and reduced ATP/ADP ratio are unrelated events induced by oxidative stress in synaptosomes. *J. Neurochem.* 1997;69:2529-2537

Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci.* 2000;20:8972-8979

Verkhratsky A, Butt A. *Glial Neurobiology. A Textbook.* John Wiley & Sons, Ltd 2007

Venters HD, Dantzer R, Kelley KW. Tumor necrosis factor- α induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:210-220

Walz W, Ilschner S, Ohlemeyer C, Banati R, Kettenmann H. Extracellular ATP activates a cation conductance and a K⁺ conductance in cultured microglial cells from mouse brain. *J Neurosci.* 1993; 13:4403-4411

Weis C, Humpel C. Evidence that toxicity of lipopolysaccharide upon cholinergic basal forebrain neurons requires the presence of glial cells in vitro. *Brain Res Bulletin* 2002;58:91-98

Woo MS, Jang PG, Park JS, Kim WK, Joh TH, Kim HS. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathway by dibutyryl-cAMP in BV2 microglial cells. *Mol Brain Res.* 2003;113:86-96

Woo MS, Jung SH, Hyun JW, Kim HS. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine gene expression by forskolin and dibutyryl-cAMP in lipopolysaccharide-stimulated murine BV2 microglial cells. *Neurosci Lett.* 2004;356:187-190

Wright JA, Maeba P, Sanwall BD. Allosteric regulation of the activity of citrate synthase of *Escherichia coli* by α -ketoglutarate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967; 29: 34-40

Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1993;177:1779-1784

Yoshioka Y, Takeda N, Yamamuro A, Kasai A, Maeda S. Nitric oxide inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression and its own production through the cGMP signalling pathway in murine microglia BV-2-cells. *J Pharmacol Sci* 2010;113:153-160

Zhang B, Yang L, Konishi Y, Maeda N, Masahiro S, Tanaka J. Suppressive effects of phosphodiesterase type IV inhibitors on rat cultured microglial cells: comparison with other types of cAMP-elevating agents. *Neuropharmacology* 2002;42:262-269

Zhang J, Geula C, Lu C, Koziel H, Hatcher LM, Roisen FJ. Neurotrophins regulate proliferation and survival of two microglial cell lines in vitro. *Exp Neurol*. 2003;182:468-469

Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J*. 2005;19: 533-542.

Zhao S, Zhang L, Lian G, Wang X, Zhang H, Yao X, Yang J, Wu C. Sildenafil attenuates LPS-induced proinflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF- κ B signalling pathways in N9 microglia. *Int Immunopharmacol*. 2011;11:468-474