

VII. Streszczenie

Astrocyty to najliczniejsze komórki w układzie nerwowym, są niezbędne do ochrony neuronów przed ekscytotoksycznością glutaminianu i stresem oksydacyjnym. Odgrywają one również kluczową rolę w plastyczności neuronów, biorąc udział w formowaniu i zanikaniu synaps, jak również zapewniają neuronom substraty metaboliczne i energetyczne. Ich wypustki otaczające synapsy współtworzą strukturę trójsynapsy oraz stanowią jeden z trzech elementów bariery krew-mózg. Zaktywowane astrocyty uczestniczą zarówno w inicjacji, jak i wygaszaniu procesów zapalnych tkanki nerwowej wywołanych poprzez uszkodzenie lub infekcje CNS. Sam proces zapalny stanowi jedną z przyczyn rozwoju i/lub przyspieszenia istniejących zmian neurodegeneracyjnych, w tym tych związanych z chorobą Parkinsona, chorobą Alzheimera (AD) i stwardnieniem zanikowym bocznym. Wiele danych wskazuje na to, że za procesy neurodegeneracyjne odpowiedzialna jest m.in. dysfunkcja mitochondriów. Zaburzenia w bioenergetyce, kontroli jakości mitochondriów (fuzja i podział) oraz w mitofagii, zostały zidentyfikowane jako czynniki patogenezy chorób neurologicznych.

Wyniki licznych badań efektu suplementacji diety zwierząt i ludzi kwasami tłuszczowymi omega-3 (LC-PUFA n-3), czyli DHA i EPA, wskazują wpływ działania tych kwasów na poprawę zdolności poznawczych oraz ograniczenie skutków doświadczalnego uszkodzenia CNS. Wykazano, że suplementacja LC-PUFA n-3 zmniejsza zaburzenia pamięci we wczesnych stadiach AD oraz w demencji związanej z wiekiem, a także wykazuje właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne w astrocytach. Nierozpoznanym jednak do tej pory zagadnieniem jest wpływ LC-PUFA n-3 na czynność mitochondriów. Warto również podkreślić, że chociaż w piśmiennictwie istnieją sugestie wskazujące na odmienne działanie tych kwasów w przebiegu wielu chorób, to do wzbogacania diety wykorzystywany jest najczęściej olej rybi lub oba kwasy jednocześnie.

Eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy miały na celu zbadanie wpływu LC-PUFA n-3 na czynność mitochondriów i przeżywalność astrocytów oraz wskazanie potencjalnych różnic w działaniu DHA i EPA. Badania przeprowadzono na pierwszorzędowych astrocytach izolowanych z kory mózgu szczura. Najpierw określono wpływ różnych stężeń DHA i EPA na przeżywalność astrocytów testem MTT,

następnie zmierzono skład kwasów tłuszczowych w błonach mitochondrialnych po 24-godzinnej inkubacji astrocytów z kwasami w wybranym stężeniu 30 μM . Takie warunki zastosowano do wszystkich kolejnych eksperymentów. Przy użyciu fluorescencyjnego znacznika JC-10 określono zmiany potencjału mitochondriów (Ψm), natomiast przy użyciu Mitotracker Red zobrazowano strukturę sieci mitochondrialnej. Po wyznaczeniu komórek jodkiem propidyny i aneksyną V z FITC określono metodą cytometrii przepływowej stopień aktywacji apoptozy, z kolei ekspresję samych białek związanych

z procesem apoptozy (Bax i Bcl-2) zmierzono metodą Western blot. Zmierzono także ilość ATP i produkcję reaktywnych związków w komórkach stosując odpowiednio metodę chemiluminescencyjną oraz metodę fluorescencyjną.

Analiza składu kwasów tłuszczowych wykazała, że inkubacja komórek z DHA spowodowała wzrost zawartości tego kwasu w błonach mitochondrialnych przy jednoczesnym spadku zawartości EPA. Z kolei inkubacja z EPA skutkowała wzrostem zawartości obu kwasów w błonach. Badanie cytotoksyczności DHA i EPA na astrocyty wykazało, że w zakresie stężeń od 5 do 100 μM i do 72 godzin hodowli, cytotoksyczność EPA była mniejsza niż DHA. Kolejne wyniki wykazały, że DHA i EPA porównywalnie chroniły astrocyty przed cytotoksycznym działaniem CCCP (związek rozpręgający gradient protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej) i H_2O_2 . Ponadto, oba kwasy w dawko-zależny sposób zmniejszyły ilość reaktywnych związków produkowanych w komórkach kontrolnych oraz traktowanych H_2O_2 lub CCCP. Jednakże, EPA silniej niż DHA hamował produkcję reaktywnych związków indukowaną CCCP oraz podwyższał Ψm w komórkach kontrolnych, a także w tych traktowanych CCCP hodowanych w podłożu z glukozą. Pomimo wzrostu Ψm po inkubacji z EPA, w komórkach tych nie zaobserwowano istotnej statystycznie zmiany zawartości ATP w porównaniu do komórek kontrolnych. Analiza cytometryczna wykazała, że tylko EPA zmniejszał liczbę komórek apoptotycznych oraz silniej niż DHA, hamował aktywację apoptozy wyznaczoną stosunkiem ekspresji białek Bax/Bcl-2. Poszukując mechanizmu, dzięki któremu EPA wyraźnie podwyższył potencjał mitochondrialny, zmierzono zawartość kardiolipiny, tetraglicerofosfolipidu, który występuje wyłącznie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Fosfolipid ten warunkuje prawidłowe formowanie grzebieni mitochondrialnych i skuteczne działanie superkompleksów

enzymatycznych łańcucha oddechowego. Wyniki wykazały, że EPA w dawko-zależny i statystycznie istotny sposób zwiększył zawartość kardiolipiny w błonach mitochondriów, co mogło być powodem podwyższenia Ψ_m .

Ważnym, a do tej pory nieraportowanym w literaturze działaniem EPA, jest jego wpływ na ilość kardiolipiny w IMM oraz podwyższenie Ψ_m . Choć oba kwasy LC-PUFA redukowały ilość powstających spontanicznie ROS w komórkach, to EPA skuteczniej niż DHA hamował powstawanie ROS w odpowiedzi na traktowanie astrocytów CCCP. Wykazane różnice działania EPA i DHA na czynność mitochondriów i przeżywalność astrocytów oraz na aktywację apoptozy mogą w istotny sposób wpłynąć na opracowywanie wytycznych stosowania EPA i DHA w profilaktyce chorób neurologicznych związanych z wiekiem.