

INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

IM. M. MOSSAKOWSKIEGO PAN

ZAKŁAD NEUROCHEMII

PRACOWNIA PATONEUROCHEMII

TOMASZ GRYGOROWICZ

ROLA RECEPTORA PURYNERGICZNEGO P2X7 W
PATOMECHANIZMACH AUTOIMMUNOLOGICZNEGO
ZAPALENIA MÓZGU I RDZENIA KRĘGOWEGO (EAE)

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

dr hab. n. med. Lidii Strużyńskiej, prof. IMDiK

Warszawa 2016 r

Chciałbym złożyć serdeczne podziękowania Pani dr hab. n. med. Lidii Strużyńskiej za patronat naukowy, pomoc oraz okazaną mi cierpliwość.

Składam również serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. n. med. Janinie Rafałowskiej oraz Pani dr n. med. Hannie Kozłowskiej za udzieloną mi pomoc w pracy.

Chciałbym podziękować całemu zespołowi Zakładu Neurochemii oraz kolegom i koleżankom z IMDiK za owocną współpracę oraz przyjazną atmosferę.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w pracach:

- **Tomasz Grygorowicz**, Marlena Wełniak-Kamińska, Lidia Strużyńska. (2016) Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 74; 1-9 (IF: 3,84)
- **Tomasz Grygorowicz**, Dorota Sulejczak, Lidia Strużyńska. (2011) Expression of purinergic P2X7 receptor in rat brain during the symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis and after recovery of neurological deficits. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 71; 1-9 (IF: 2,24)
- **Tomasz Grygorowicz**, Lidia Strużyńska, Grzegorz Sulkowski, Małgorzata Chalimoniuk, Dorota Sulejczak. (2010) Temporal expression of P2X7 purinergic receptor during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochemistry International* 57; 823–829 (IF: 3,09)

Badania, których wyniki umieszczono w niniejszej pracy doktorskiej zostały wykonane częściowo w ramach funduszy pochodzących z projektu badawczego finansowanego przez: Narodowe Centrum Nauki grant nr: DEC-2012/05/N/NZ4/02191 oraz funduszy statutowych przyznanych przez MNiSW dla IMDiK PAN.

Spis treści.....	4
Wykaz skrótów	7
Streszczenie.....	11
Abstract	14
1. Wstęp.....	17
1.1. Rys historyczny badań nad stwardnieniem rozsia­nym.....	17
1.2. Epidemiologia stwardnienia rozsia­nego.....	18
1.3. Etiologia stwardnienia rozsia­nego.....	19
1.4. Objawy i formy stwardnienia rozsia­nego.....	21
1.5. Zmiany patologiczne w OUN w przebiegu SM.....	22
1.5.1. Aktywacja komórek układu odpornościowego specyfic­nych dla antygenów mielinowych.....	23
1.5.2. Komponent neuronalny w SM	24
1.6. Leki stosowane w terapii stwardnienia rozsia­nego.....	25
1.6.1. Leki immunomodulujące	25
1.6.2. Leki cytotoksyczne.....	27
1.7. Modele zwierzęce SM - EAE	28
1.8. Badania patomechanizmów EAE	30
1.8.1. Rozszczelnienie bariery krew-mózg	30
1.8.2. Rola astrocytów w rozwoju SM/EAE	34
1.8.3. Interakcje astrocytów z komórkami układu odpornościowego w przebiegu SM/EAE.....	36
1.9. Receptory purynergiczne.....	37
1.10. Receptor P2X7.....	37
1.10.1. Budowa białka P2X7R.....	37
1.10.2. Lokalizacja P2X7R w ośrodkowym układzie nerwowym	40
1.10.3. Działanie P2X7R.....	41
1.10.4. Paneksyna 1 jako składnik aktywnego receptora P2X7	44
1.10.5. Udział P2X7R w stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego	45
1.10.6. P2X7R w SM/EAE.....	46
2. Założenia i cel pracy.....	48

3.	Materiał i Metody	49
3.1.	Zwierzęta doświadczalne.....	49
3.2.	Model stwardnienia rozsianego - autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego.....	49
3.3.	Zabieg chirurgiczny zakładania cewników dożylnych w celu podania antagonisty receptora P2X7.....	50
3.4.	Grupy eksperymentalne	51
3.5.	Przygotowanie materiału do badań	52
3.5.1.	Preparatyka homogenatów mózgowych	52
3.5.2.	Izolacja frakcji komórkowej pochodzenia astrocytarnego (GPV, gliosomy)	52
3.5.3.	Izolacja frakcji zakończeń nerwowych (frakcja synaptosomalna).....	52
3.5.4.	Izolacja frakcji mielinowej	53
3.5.5.	Izolacja frakcji mikronaczyń mózgowych	53
3.6.	Analiza histologiczna materiału otrzymanego ze zwierząt poddanych EAE	54
3.6.1.	Barwienie hematoksylina-eozyna	55
3.6.2.	Barwienie fioletem krezyłu.....	55
3.6.3.	Barwienia GFAP oraz albuminy	55
3.7.	Analiza mRNA receptora P2X7 metodą RT-PCR	56
3.7.1.	Izolacja całkowitego RNA z mózgu szczura	56
3.7.2.	Reakcja RT-PCR.....	56
3.8.	Elektroforeza białka i immunodetekcja metodą Western blot.....	57
3.8.1.	Oznaczenie stężenia białka metodą Lowry'ego	57
3.8.2.	Rozdział elektroforetyczny białek	57
3.8.3.	Elektrotransfer białek.....	58
3.8.4.	Immunodetekcja białek.....	58
3.9.	Barwienia immunohistochemiczne mózgów zwierząt kontrolnych oraz poddanych EAE.....	61
3.9.1.	Przygotowanie skrawków mózgów do barwień immunohistochemicznych	61
3.9.2.	Procedura barwienia	61
3.10.	Analiza mikroskopowa	63
3.11.	Analiza statystyczna	63
4.	Wyniki	64
4.1.	Model autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (EAE)	64

4.1.1.	Rozwój i przebieg EAE	64
4.1.2.	Charakterystyka zmian histopatologicznych w przebiegu EAE	67
4.2.	Czasowy profil ekspresji P2X7R w mózgu szczurów kontrolnych oraz poddanych EAE.....	69
4.2.1.	Identyfikacja komórkowej lokalizacji receptora P2X7	71
4.2.1.1.	Ekspresja P2X7R w mielinie	72
4.2.1.2.	Neuronalna ekspresja P2X7R.....	72
4.2.1.3.	Astrocytarna ekspresja P2X7R.....	74
4.2.1.4.	Ekspresja P2X7R w mikrogleju.....	81
4.2.1.5.	Ekspresja P2X7R w mikronaczyniach.....	81
4.3.	Pośrednia ocena aktywności P2X7R w przebiegu EAE na podstawie wybranych białek..	89
4.3.1.	Ekspresja paneksyny 1 w przebiegu EAE.....	89
4.3.2.	Poziom białka cytokin prozapalnych w przebiegu EAE	89
4.4.	Ocena wpływu antagonisty P2X7R – Brilliant Blue G – na rozwój i przebieg EAE oraz wybrane procesy patologiczne w przebiegu choroby	96
4.4.1.	Wpływ podania BBG na przebieg fazy objawowej EAE.....	96
4.4.2.	Wpływ podania BBG na poziom białka P2X7R	98
4.4.3.	Wpływ podania antagonisty P2X7R na aktywację astrocytów	98
4.4.4.	Wpływ podania antagonisty P2X7R na aktywację mikrogleju	102
4.4.5.	Wpływ podania BBG na zmiany profilu cytokin prozapalnych u zwierząt z EAE.....	104
4.4.6.	Wpływ podania antagonisty P2X7R na poziom białka kładyna 5	108
5.	Dyskusja	110
5.1.	Zasadność użycia modelu EAE i jego charakterystyka.....	110
5.2.	Ekspresja i aktywność P2X7R w mózgu zwierząt w przebiegu EAE.....	113
5.3.	Wpływ antagonisty P2X7R na przebieg EAE oraz na wybrane procesy patologiczne.....	125
5.4.	Perspektywy użycia antagonistów P2X7R w leczeniu	128
6.	Podsumowanie wyników	130
7.	Wnioski.....	131
8.	Literatura.....	132

Wykaz skrótów

ANOVA	- analiza wariancji (<i>ang. analysis of variance</i>)
ATP	- adenozynotrójfosforan (<i>ang. adenosine triphosphate</i>)
BAFF	- <i>ang. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family</i>
BBB	- bariera krew-mózg (<i>ang. blood-brain barrier</i>)
BBG	- <i>ang. Briliant Blue G</i>
BDNF	- neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (<i>ang. brain-derived neurotrophic factor</i>)
BSA	- albumina surowicy bydłowej (<i>ang. bovine serum albumine</i>)
BzATP	- 2',3'-O-(4-benzoylo-benzoyl)adenozyno 5'-trójfosforan
CD	- antygen różnicowania komórkowego (<i>ang. cluster of differentiation</i>)
CFA	- kompletny adiuwant Freund'a (<i>ang. complete Freund's adjuvant</i>)
CX3CL1	- chemokina z motywem C-X3-C (<i>ang. C-X3-C motif chemokine ligand 1</i>)
CXCL12	- chemokina z motywem C-X-C (<i>ang. C-X-C motif chemokine ligand 12</i>)
DHODH	- dehydrogenaza kwasu dihydroorotowego (<i>ang. dihydroorotate dehydrogenase</i>)
dpi	- dni po immunizacji
DTT	- ditiotreitól
EAE	- autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (<i>ang. experimental autoimmune encephalomyelitis</i>)
EBV	- wirus Ebsteina-Barr (<i>ang. Ebstein-Barr virus</i>)

EC	- komórki endotelialne (<i>ang. endothelial cells</i>)
eCB	- endogenne kanabinoidy (<i>ang. endocannabinoids</i>)
EDTA	- kwas wersenowy (<i>ang. ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMA	- Europejska Agencja Leków (<i>ang. European Medicines Agency</i>)
FDA	- Agencja Żywności i Leków (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
GA	- glatiramer
GAPDH	- dehydrogenaza aldehydu 3 fosfoglicerynowego (<i>ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GFAP	- glejowe kwaśne białko włókienkowe (<i>ang. Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GPV	- gliosomy (<i>ang. glial plasmalemmal vesicles</i>)
HHV-6	- herpeswirus 6 (<i>ang. human herpesvirus 6</i>)
HLA	- układ zgodności tkankowej (<i>ang. human leukocyte antigen</i>)
Iba1	- <i>ang. ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
ICAM-1	- międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1 (<i>ang. Intercellular adhesion molecule 1</i>)
IFN	- interferon
IL	- interleukina ☐
JAM	- białka adhezji komórkowej (<i>ang. junctional adhesion molecule</i>)
JCV	- wirus Johna Cunninghama (<i>ang. John Cunningham virus</i>)
LPS	- lipopolisacharyd
Lt- α	- limfotoksyna α
MAG	- glikoproteina związana z mieliną (<i>ang. myelin associated glycoprotein</i>)

MBP	- zasadowe białko mieliny (<i>ang. myelin basic protein</i>)
MCP-1	- białko chemotaktyczne monocytów 1 (<i>ang. monocyte chemotactic protein 1</i>)
MHC	- główny układ antygenów zgodności tkankowej (<i>ang. major histocompatibility complex</i>)
MOG	- glikoproteina mieliny i oligodendrocytów (<i>ang. myelin-oligodendrocyte glycoprotein</i>)
NeuN	- białko jądrowe specyficzne dla dojrzałych neuronów (<i>ang. neuronal nuclei antigen</i>)
NF-κB	- <i>ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell</i>
OUN	- ośrodkowy układ nerwowy
Ox-ATP	- utleniony ATP (<i>ang. oxidized ATP</i>)
Panx	- paneksyna (<i>ang. pannexin</i>)
PBS	- roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (<i>ang. phosphate buffered saline</i>)
PDGFRβ	- receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β (<i>ang. platelet-derived growth factor receptor β</i>)
PECAM	- płytkowa/endotelialna cząsteczka adhezji komórkowej (<i>ang. platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
PFA	- paraformaldehyd (<i>ang. paraformaldehyde</i>)
PLP	- białko proteolipidowe mieliny (<i>ang. myelin proteolipid protein</i>)
PML	- postępująca wielogniskowa leukoencefalopatia (<i>ang. progressive multifocal leukoencephalopathy</i>)
PSGL-1	- ligand glikoproteinowy dla P-selektyn 1 (<i>ang. P-selectin glycoprotein ligand 1</i>)
RT-PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (<i>ang. reverse transcription polymerase chain reaction</i>)

S1PR	- receptor 1-fosfosfingozyny (<i>ang. sphingosine 1-phosphate receptor</i>)
S100 β	- antygen dojrzałych astrocytów (<i>ang. S100 calcium binding protein β</i>)
SDS-PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodecylosiarczanem sodu (<i>ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SM	- stwardnienie rozsiane (łac. sclerosis multiplex, <i>ang. multiple sclerosis</i>)
TCR	- receptor limfocytów T (<i>ang. Tcell Receptor</i>)
TGF- β	- transformujący czynnik wzrostu β (<i>ang. Transforming Growth Factor β</i>)
Th	- limfocyt T pomocniczy (<i>ang. T helper</i>)
TNF- α	- czynnik martwicy nowotworu α (<i>ang. tumor necrosis factor α</i>)
UV	- promieniowanie ultrafioletowe (<i>ang. ultraviolet</i>)
VCAM-1	- cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (<i>ang. vascular cell adhesion molecule</i>)
ZO	- białko połączeń ścisłych (łac. zonula occludens)

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (SM) jest chorobą demielinizacyjną o podłożu autoimmunologicznym, dotyczącą młode dorosłe osoby (20-40 lat). Prowadzi ona do trwałych, postępujących uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i jest najczęstszą przyczyną niepełnosprawności w tej grupie wiekowej. Etiologia choroby nie została do tej pory wyjaśniona, chociaż poznano szereg czynników, które zwiększają prawdopodobieństwo jej powstania, są to m.in.: niedostateczna ekspozycja na światło słoneczne, zakażenia wirusowe oraz czynniki genetyczne.

Do tej pory poznano wiele procesów zaangażowanych w przebieg SM. Wiadomo, że dochodzi do „uczulenia” układu odpornościowego na białka mieliny. Komórki odpornościowe, poprzez rozszczelnioną barierę krew-mózg, napływają do ośrodkowego układu nerwowego, a następnie niszczą osłonki mielinowe aksonów. Postępujące zniszczenie mieliny powoduje uszkodzenie aksonów i śmierć komórek nerwowych, czemu towarzyszy stan zapalny OUN.

W leczeniu SM wykorzystuje się głównie leki immunomodulujące takie jak interferon β czy glatiramer. Leki te redukują częstość występowania oraz siłę rzutów choroby, spowalniając jej postęp, jednak nie prowadzą do wyleczenia pacjenta i dodatkowo obarczone są wieloma skutkami ubocznymi. Dlatego też istnieje potrzeba opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Receptor purynergiczny P2X7 należy do rodziny receptorów jonotropowych P2X, którego naturalnym agonistą jest ATP, a specyficznym sztucznym antagonistą Brilliant Blue G (BBG). P2X7R jest białkiem rozpowszechnionym w układzie nerwowym, występuje zarówno na neuronach jak i komórkach glejowych. Dane literaturowe wskazują, że w warunkach patologicznych receptor ten może uczestniczyć w wydzielaniu cytokiny prozapalnej IL-1 β , będąc aktywnie włączonym w indukcję stanu zapalnego. Posiada on również zdolność do oligomeryzacji i tworzenia poru błonowego, który poprzez zaburzenie szczelności błony komórkowej, może prowadzić do śmierci komórki. Tak więc, skutki nadmiernej aktywacji tego receptora mogą obejmować zarówno stan zapalny jak i zmiany neurodegeneracyjne. Obie te składowe obserwuje się w przebiegu SM. Dotychczasowe badania wykazały udział tego receptora w rozwoju zmian neurodegeneracyjnych w różnych patologich OUN. U

chorych na stwardnienie rozsiane zaobserwowano zależność pomiędzy wzrostem ekspresji P2X7R, a uszkodzeniem oligodendrocytów. Wyniki badań eksperymentalnych na zwierzętach pozbawionych genu dla receptora P2X7, u których wywoływano autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (ang. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE), są niespójne i wskazują zarówno na udział tego receptora w indukowaniu choroby, jak i jego protekcyjną rolę.

Celem niniejszej rozprawy było zbadanie komórkowej ekspresji receptora P2X7 oraz jego udziału w rozwoju zmian obserwowanych w przebiegu autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego, będącego zwierzęcym modelem SM.

Wykorzystany w badaniach szczurzy model SM, autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, polegał na podaniu podskórnym preparatu składającego się z homogenatu rdzenia kręgowego świnki morskiej, kompletnego adiuwantu Freund'a i *Mycobacterium tuberculosis*. Immunizacja szczura białkami mieliny świnki morskiej skutkuje uszkodzeniem mieliny i rozwojem stanu zapalnego OUN oraz wystąpieniem charakterystycznych objawów neurologicznych. Stan zdrowia zwierząt był określany poprzez ocenę deficytów neurologicznych oraz zmianę masy ciała. W celu zablokowania aktywności receptora P2X7 zwierzętom podawano antagonistę – BBG, w dawce 50 mg/kg masy ciała, poprzez cewnik dożylny przez pierwsze 6 dni bezobjawowej fazy choroby (0 - 6 dpi). W mózgu oznaczano ekspresję receptora P2X7, szereg markerów stanu zapalnego oraz markerów aktywacji komórek glijowych, za pomocą technik takich jak RT-PCR, Western blot oraz barwienia: histochemiczne oraz immunohistochemiczne.

W pierwszym etapie badań scharakteryzowano model eksperymentalny pod względem zmian patologicznych w rdzeniu kręgowym oraz mózgu za pomocą barwień histochemicznych i immunohistochemicznych. Barwienia wykazały obecność zmian patologicznych w mózgu w postaci nacieków zapalnych wokół naczyń już w fazie bezobjawowej EAE, natomiast w rdzeniu kręgowym dopiero w fazie objawowej.

Za pomocą barwień immunohistochemicznych oraz techniki Western blot, określono ekspresję białka P2X7R w homogenacie mózgu oraz we frakcjach mózgowych takich jak: synaptosomy, gliosomy, mielina i mikronaczynia. Badania te wykazały zwiększony poziom białka P2X7R we frakcji glicyjowej w fazie bezobjawowej EAE, a we frakcji synaptosomalnej w fazie objawowej choroby. Wykazano również po raz pierwszy obecność P2X7R w obrębie mikronaczyń mózgu, na pericytach. Natomiast nie zaobserwowano zmian ekspresji białka

P2X7R we frakcji mielinowej. Ponadto, stwierdzono obecność wczesnej (w fazie bezobjawowej) aktywacji komórek glejowych w trakcie EAE, dotychczas nie opisanej w literaturze.

Badania cytokin prozapalnych w trakcie rozwoju EAE wykazały wzrost poziomu białka IL-1 β , IL-6, TNF- α , osiągający maksimum w szczycie objawów chorobowych. Wykazano również wzrost immunoreaktywności białka paneksyna 1 na neuronach w fazie bezobjawowej EAE, co wskazuje na aktywację receptora P2X7.

Aby potwierdzić potencjalny udział receptora P2X7 w patomechanizmach EAE zwierzętom podano antagonistę P2X7R – BBG. Wykazano, że blokowanie aktywności receptora powoduje poprawę stanu zdrowia zwierząt z EAE, które wykazują opóźnione wystąpienie objawów, a także łagodniejszy przebieg choroby. Podanie BBG powodowało również zmniejszenie aktywacji komórek glejowych, spadek poziomu cytokin prozapalnych, oraz miało protekcyjny wpływ na poziom markera przepuszczalności bariery krew-mózg w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na udział receptora P2X7 w patomechanizmie EAE. Obserwowana w przebiegu EAE wczesna aktywacja gleju o profilu prozapalnym, jak również wzmożona przepuszczalność bariery krew-mózg są procesami przynajmniej częściowo zależnymi od aktywności receptora P2X7.

Abstract

Sclerosis multiplex (MS) is an autoimmune, demyelinating disease which affects young adults between 20 to 40 years old. MS leads to permanent, progressing central nervous system (CNS) injury and is the most frequent reason of young adults disability. The etiology of MS is still unknown, although there are some factors that increase the risk of MS onset: insufficient exposition to sunlight, viral infections and genetic factors.

So far, there are many mechanisms known to be involved in the course of MS. The immune system sensitizes itself to myelin proteins, immune cells migrate to CNS through disrupted blood-brain barrier and destroy myelin sheaths of neurons. Progressing myelin damage causes destruction of axons and subsequent death of neurons, what is accompanied by the inflammation of the CNS.

Immunomodulatory drugs as interferon β and glatiramer are most frequently used in MS therapy. These drugs reduce the frequency and severity of the relapses slowing down the progression of the disease. However, they do not treat the cause of the disease and in addition give some side effects. Thus, there is a vital need to develop new therapeutic strategies.

Purinergic P2X7 receptor belongs to ionotropic receptors family P2X. ATP is a natural agonist of P2X7, whereas Brilliant Blue G (BBG) is its artificial specific antagonist. P2X7R is a protein widespread in the nervous system. It is present both on neurons and glial cells. Previous reports show that under pathological conditions this receptor may contribute to the secretion of proinflammatory cytokine IL-1 β , being involved in the induction of inflammation. P2X7R can undergo oligomerization and form membrane pore which can lead to cell death through disruption of membrane integrity. Overactivation of P2X7R can lead to inflammation and neurodegeneration. Both of these processes are observed during the course of MS. Previous studies showed the role of P2X7R in some neurodegenerative disorders of the CNS. In MS patients the increase of P2X7R expression was shown to be correlated with oligodendrocyte damage. Studies in P2X7R knock-out animals subjected to EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) are not conclusive, showing both the contribution of P2X7 to the induction of the disease and its protective role.

The aim of the present doctoral thesis was to investigate the cellular expression of P2X7R and its contribution to the development of changes observed in experimental autoimmune encephalomyelitis, which is an animal model of MS.

EAE was induced by subcutaneous injection of guinea pig spinal cord homogenate with complete Freund's adjuvant and *Mycobacterium tuberculosis*. The immunization of rat with myelin proteins of guinea pig leads to myelin damage, development of CNS inflammation and characteristic neurological symptoms. The condition of animals was evaluated by the assessment of neurological deficits and body weight. To block the activity of P2X7R, animals were injected with its antagonist – BBG in a dose of 50 mg/kg of body weight, through the jugular catheter. BBG was administered daily for 6 consecutive days of asymptomatic phase of the disease (0 to 6 days post immunization). The expression of P2X7R as well as the expression of selected markers of inflammation and glial activation was assessed in brain tissues by RT-PCR, Western blot analysis, histochemical and immunohistochemical staining.

In the initial phase of this study, the rat EAE model was characterized by the evaluation of pathological changes in spinal cord and brain of animals by histochemical and immunohistochemical staining. Analysis showed pathological changes such as immune cells infiltrating brain parenchyma from vessels in asymptomatic phase of EAE, whereas in spinal cord these changes were observed in symptomatic phase.

The expression of P2X7R was determined in brain homogenates and brain fractions such as: synaptosomes, gliosomes, myelin and microvessels by immunohistochemistry and Western blot analysis. The results showed the increased level of P2X7R protein in glial fraction and in synaptosomes, in asymptomatic and symptomatic phase of EAE, respectively. It was also shown for the first time that P2X7R is expressed in brain microvessels, on pericytes. Unexpectedly there were no changes in P2X7R protein level in myelin fraction. Moreover, this is the first study which reports the activation of glial cells in the early, asymptomatic phase of EAE.

The analysis of proinflammatory cytokines revealed the increased protein level of IL-1 β , IL-6 and TNF- α during the development of EAE reaching the maximum at the peak of the disease. Moreover, an increase in the immunoreactivity of pannexin 1 protein was noticed on neurons in the asymptomatic phase of EAE, indicating activation of the P2X7 receptor.

Additionally, P2X7R antagonist – BBG - was administered to animals to confirm the role of P2X7R in pathomechanisms of EAE. Obtained results showed that P2X7R blockade improved condition of animals subjected to EAE. The animals showed delayed onset of EAE, and less severe symptoms of the disease. BBG administration resulted also in the decreased level of proinflammatory cytokines, the inhibition of glial activation and protection of the blood-brain barrier integrity.

Altogether, these results suggest involvement of P2X7R into pathomechanisms of EAE. Early proinflammatory profile of glia activation together with enhanced permeability of the BBB, which are observed during EAE development are, to a certain extent, P2X7-related processes.

1. Wstęp

1.1. Rys historyczny badań nad stwardnieniem rozsianym

Stwardnienie rozsiane (SM, łac. Sclerosis multiplex, ang. Multiple Sclerosis) jest chorobą, która towarzyszy ludzkości prawdopodobnie już od bardzo dawna. Dostępne materiały historyczne opisują przypadki osób, które na nią chorowały. Jednym z takich opisów jest historia holenderskiej zakonnicy Ludwiny z Schiedam, żyjącej w latach 1380-1433, u której w wieku 15 lat pojawiły się problemy z chodzeniem. W wieku 19 lat problemy te nasiliły się i dodatkowo wystąpił niedowład połowy twarzy oraz zaburzenia widzenia (oślepla na prawe oko natomiast lewe stało się nadwrażliwe na światło). Okresom remisji objawów towarzyszyła euforia. Wraz z rozwojem choroby zaobserwowano trudności w przełykaniu oraz bóle charakterystyczne dla późnego SM. Według dostępnych danych archiwalnych jest wysoce prawdopodobne, że zakonnica chorowała na stwardnienie rozsiane (Swiderski 1998).

Bardzo dobrze opisanym przypadkiem stwardnienia rozsianego jest choroba Augusta Frederyka d'Este (1794-1848), wnuka Króla Jerzego III. Pozostawił on po sobie dzienniki, które zostały zaakceptowane przez środowisko naukowe jako opis SM. Pierwszymi zanotowanymi objawami choroby była przejściowa utrata wzroku, następnie pojawiło się postępujące ogólne osłabienie, problemy z chodzeniem, bolesne skurcze oraz depresja.

Innym ciekawym wczesnym przekazem o SM jest pamiętnik Bruce'a Fredericka Cummingsa, który pod pseudonimem W. N. P. Barbellion opublikowany został w 1919 roku jako „The Journal of a Disappointed Man” (Pearce 2005).

Pierwszy medyczny opis stwardnienia rozsianego został wykonany przez W. McKenzie'go w 1840 roku. Opisał on przypadek 23-letniego mężczyzny, u którego wystąpiło postępujące porażenie kończyn dolnych oraz problemy ze wzrokiem, następnie rozwinęła się asymetryczna słabość ramion oraz dyzartria (zaburzenia mowy). Po 3 tygodniach objawy osłabły, a po kolejnych 2 miesiącach nastąpiła remisja, chory mógł ruszać dłońmi i ramionami, poprawie uległo również widzenie (Pearce 2005).

W roku 1837 Sir Robert Carswell opisał zmiany demielinizacyjne u chorych na SM, jednak nie stwierdził korelacji pomiędzy tymi zmianami a objawami klinicznymi choroby. Natomiast w 1841 roku Jean Cruveilhier opublikował dane dotyczące obecności lezji w

ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) u chorych na SM. Obserwacje Carswella jak i Cruveilhiera, mimo że pracowali niezależnie, są bardzo zbieżne. Ważne cechy SM – remisyjny charakter choroby oraz oczopląs - zostały po raz pierwszy opisane przez Friedricha von Frerichsa w 1849 roku, a w 1863 roku Rindfleisch stwierdził udział naczyń krwionośnych w powstawaniu zmian zapalnych w mózgu w przebiegu SM (Pearce 2005).

Stwardnienie rozsiane po raz pierwszy zostało opisane jako odrębna jednostka chorobowa przez słynnych XIX-wiecznych neurologów Jean-Martina Charcot'a oraz Alfreda Vulpian'a w 1866 roku. Opisali oni zarówno objawy jak i zmiany patologiczne występujące w chorobie. Charcot nazwał SM „sclerose en plaques”. Opisał on również trzy podstawowe objawy towarzyszące SM tzw. triadę Charcot'a: dyzartria, ataksja i drżenie (Pearce 2005).

1.2. Epidemiologia stwardnienia rozsianego

Obecnie stwardnienie rozsiane zostało rozpoznane u blisko 2,3 miliona osób na świecie (dane za serwisem internetowym: Multiple Sclerosis International Federation, www.msif.org), w tym u 400000 w Europie (dane za serwisem internetowym: European Multiple Sclerosis Platform, www.emsp.org). W Polsce współczynnik chorobowości SM (liczba chorych na daną chorobę) wynosi 45-91/100000 osób, a szacowana liczba chorych sięga 17325 – 35035 (Losy 2013).

Stwardnienie rozsiane dotyka głównie młode dorosłe osoby, w wieku między 20 a 40 lat. Ryzyko zachorowania na SM wynosi około 1:400. Częściej chorują kobiety niż mężczyźni, w stosunku 2:1, podobnie jak w przypadku innych chorób autoimmunologicznych (Compston i Coles 2002). SM dotyka około 0,1% populacji krajów zachodnich. Pięćdziesiąt procent osób dotkniętych SM potrzebuje pomocy w chodzeniu w przeciągu 15 lat od zdiagnozowania choroby (Noseworthy i wsp. 2000).

Stwardnienie rozsiane ma bardzo charakterystyczny geograficzny wzór występowania – im bliżej równika tym zapadalność jest mniejsza (Compston i Coles 2002). Najwyższa zapadalność występuje w północnej Europie, południowej Australii i środkowej części Ameryki Północnej.

Zaobserwowano jednakże tendencję wzrostową częstości zachorowań również w innych rejonach świata, na przykład w południowej Europie i amerykańskim stanie Minnesota, gdzie wzrosła ona z 2 do 6 przypadków na 100000 osób w przeciągu zeszłego

wieku. Równolegle nastąpił spadek częstości zachorowań w niektórych obszarach północnej Europy (Noseworthy i wsp. 2000).

1.3. Etiologia stwardnienia rozsianego

Historia badań nad stwardnieniem rozsianym liczy sobie już ponad 150 lat i mimo to przyczyny rozwoju tej choroby nie zostały do tej pory poznane. Dwie przyjęte w chwili obecnej teorie patogenezy SM to: teoria immunologiczna oraz neuronalna.

Teoria immunologiczna

Teoria ta zakłada powstawanie na obwodzie autoreaktywnych limfocytów T, które następnie przenikają do OUN i indukują stan zapalny, w wyniku którego tkanka nerwowa ulega uszkodzeniu. Modelem zwierzęcym takiego układu jest autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (ang. experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), w którym na obwodzie następuje immunizacja antygenami układu nerwowego. Uznaje się, że w przypadku SM odpowiedź układu odpornościowego mogłaby być wywołana reakcją krzyżową na obce antygeny (Prat i Antel 2005).

Teoria neuronalna

Teoria ta zakłada istnienie procesów patologicznych w OUN, w wyniku których zostają uwolnione antygeny tkanki nerwowej, co prowokuje układ odpornościowy do autoagresji. Potencjalnym czynnikiem inicjującym te procesy może być infekcja patogenami wykazującymi neurotropizm np. wirusami z grupy Herpes lub retrowirusami (Prat i Antel 2005).

Nie ma jednoznacznych dowodów, które wspierałyby którąś z tych teorii, prawdopodobnie oba te mechanizmy w jakimś stopniu mogą brać udział w powstaniu choroby (Berer i Krishnamoorthy 2014).

W badaniach epidemiologicznych oraz genetycznych udało się zidentyfikować czynniki, które sprzyjają rozwojowi SM.

Czynniki genetyczne a stwardnienie rozsiane

Wpływ czynników genetycznych na częstość występowania SM został potwierdzony. Ryzyko wystąpienia choroby u bliźniąt jednojajowych wynosi 24% - 31%, a u dwujajowych 5% (Pugliatti i wsp. 2008). Ryzyko wystąpienia SM u krewnych pierwszego stopnia chorych na SM wynosi poniżej 5%, jest to jednak 20-40 razy więcej niż w ogólnej populacji. Dotychczasowe badania genetyczne wykazały, że częstość występowania SM jest skorelowana z częstością występowania alleli głównego układu antygenów zgodności tkankowej klasy II (ang. major histocompatibility complex, MHC) HLA-DR2 (ang. human leukocyte antigen) (Noseworthy i wsp. 2000), HLA-DRB1*1501 (Caillier i wsp. 2008), HLA-DR15 i HLA-DQ6. Ponadto udokumentowano asocjacje różnych alleli genów dla czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α , ang. tumor necrosis factor α) (Sawcer i wsp. 2002) i podjednostki α receptora dla interleukiny-7 (IL-7RA) (Pugliatti i wsp. 2008) z ryzykiem wystąpienia SM.

Infekcje wirusowe a stwardnienie rozsiane

Przez długi czas uważano, że czynnikiem wywołującym SM jest infekcja wirusami takimi jak herpeswirus 6 (ang. human herpesvirus 6, HHV-6) oraz wirus Ebsteina-Barr (ang. Epstein-Barr virus, EBV). Badania epidemiologiczne wykazały, że 90% populacji ludzkiej jest zarażona wirusem HHV-6, natomiast badania molekularne na materiale autopsyjnym wykazały obecność wirusa w oligodendrocytach w obrębie lezji oraz podwyższony poziom przeciwciał IgM anty-HHV-6 w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na SM (Ascherio i Munger 2007). W przypadku wirusa EBV badania wykazały, że 95% procent populacji ludzkiej, a 100% chorych na SM, jest zarażona tym wirusem. Zakażenia powyższymi wirusami mogą mieć potencjalny wpływ na rozwój SM ze względu na zjawisko zwane molekularną mimikrą, w wyniku którego niektóre patogeny wykazujące podobieństwo antygenowe w stosunku do ludzkich tkanek, mogą wywoływać reakcję krzyżową na autoantygeny (Berer i Krishnamoorthy 2014).

Czynniki środowiskowe a stwardnienie rozsiane

Geograficzne zróżnicowanie zachorowalności na SM sugeruje, że czynniki środowiskowe mogą zwiększać podatność na rozwój choroby. Jednym z takich czynników

jest światło słoneczne. Stwierdzono że ekspozycja na światło słoneczne, w tym na promieniowanie ultrafioletowe (UV), w wieku 6-15 lat związana jest ze zmniejszeniem ryzyka zachorowania na SM (van der Mei i wsp. 2003). Związek światła słonecznego/UV ze spadkiem zachorowalności na SM zachodzi najprawdopodobniej poprzez zwiększenie poziomu witaminy D w organizmie. Zaobserwowano bowiem, że przyjmowanie witaminy D w diecie ma również protekcyjny charakter (Kampman i Brustad 2008).

1.4. Objawy i formy stwardnienia rozsianego

U osób, u których rozwija się stwardnienie rozsiane, pojawiają się charakterystyczne objawy kliniczne ze strony OUN takie jak zaburzenia czucia, brak koordynacji ruchowej, uszkodzenie wzroku. Pojawiające się objawy są determinowane przez lokalizację zmian w obrębie OUN. Wyróżnia się cztery główne formy SM: rzutowo-remisyjną, wtórną postępującą, pierwotnie postępującą, oraz postępująco-nawrotową. Najczęstszą jest forma rzutowo-remisyjna, na którą cierpi 80% pacjentów (Compston i Coles 2002). Diagnoza opiera się głównie na badaniach laboratoryjnych płynu mózgowo-rdzeniowego, w którym wykrywane są prążki oligoklonalne immunoglobulin IgG (Compston i Coles 2002), oraz na obrazie OUN w rezonansie magnetycznym (Noseworthy i wsp. 2000).

Stwardnienie rozsiane rzutowo-remisyjne

Objawy chorobowe nasilają się w kilkudniowych okresach, po których następuje stabilizacja, a następnie spontaniczna poprawa trwająca kilka tygodni. Ten rodzaj SM pojawia się zwykle w 2-3 dekadzie życia. Częstość występowania jest większa u kobiet niż u mężczyzn i wynosi 2:1. SM rzutowo-remisyjne zaczyna się zwykle objawami takimi jak zaburzenia czuciowe, jednostronne zapalenie nerwu wzrokowego, diplopia (zaburzenie widzenia stereoskopowego, widzenie podwójne), objaw Lhermitte'a (odczucie prądu płynącego wzdłuż kręgosłupa, kończyn lub szyi). U pacjentów obserwuje się również osłabienie kończyn, niezręczność, niezborność chodu, pęcherz neurogeny, objawy jelitowe, zmęczenie pogłębiające się wieczorem oraz podwyższenie temperatury ciała (Noseworthy i wsp. 2000). Odpowiedź na kortykosteroidy, przyspieszające poprawę po rzucie choroby, stopniowo ulega osłabieniu i pojawiają się trwałe dysfunkcje OUN. Wraz z upływem czasu choroba może postępować pomiędzy rzutami, wtedy postać ta określana jest jako **wtórnie**

postępujące SM. Rozwija się ona u 80% pacjentów z formą rzutowo-remisyjną SM, po wielu latach choroby.

Stwardnienie rozsiane pierwotnie postępujące

Ten rodzaj SM występuje u 12% pacjentów. Charakteryzuje się podobną częstością występowania u kobiet jak i u mężczyzn (Noseworthy i wsp. 2000). Występuje u osób starszych, ma również gorsze rokowania i sugeruje się, że jest to prawdopodobnie oddzielna jednostka chorobowa (Compston i Coles 2002). Pacjenci z postacią pierwotnie postępującą prezentują postępujący zespół uszkodzenia górnego neuronu ruchowego, który charakteryzuje się chroniczną postępującą mielopatią (zwyrodnienie rdzenia kręgowego). Mogą się pojawić również: tetraplegia (paraliż czterokończynowy), otępienie, utrata wzroku, dysfunkcja seksualna (Noseworthy i wsp. 2000). Podtypem pierwotnie postępującego stwardnienia rozsianego jest **stwardnienie rozsiane postępująco-nawrotowe**. Ten rodzaj SM dotyczy 6% chorych i przebiega w formie rzutów, niemniej pomiędzy rzutami obserwuje się postępowanie objawów (Losy 2013).

Choroba Hardinga

U pacjentów z chorobą Hardinga występuje obraz kliniczny oraz obraz OUN w rezonansie magnetycznym podobny jak u pacjentów z SM. W płynie mózgowo-rdzeniowym występują również prążki oligoklonalne. Jednakże u pacjentów obserwuje się nieproporcjonalnie częstsze powstawanie zmian w obrębie nerwu wzrokowego. Chorzy posiadają mutację w mitochondrialnym DNA, która zazwyczaj nie jest obecna u chorych na SM (Compston i Coles 2002).

1.5. Zmiany patologiczne w OUN w przebiegu SM

Stwardnienie rozsiane jest autoimmunologiczną chorobą ośrodkowego układu nerwowego o podłożu zapalnym, charakteryzującą się obecnością rozsianych ognisk demielinizacji.

Rozwój objawów w przebiegu SM jest skomplikowanym procesem, w którym bierze udział układ nerwowy, wraz ze wszystkimi jego składowymi, oraz układ odpornościowy. Obszary demielinizacji związane z ogniskiem nacieczenia zapalnego oraz astrogliozą (lezione)

mogą być zlokalizowane w bardzo różnych miejscach w OUN. Od lokalizacji uszkodzeń zależy zarówno rodzaj, jak i stopień nasilenia niepełnosprawności pojawiającej się u pacjentów.

W badaniach autopsyjnych stwierdzono, że lezje występują najczęściej w nerwie wzrokowym, okołokomorowej istocie białej, pniu mózgu, mózdzku, istocie białej rdzenia kręgowego, w okolicy jednego lub więcej średniej wielkości naczyń krwionośnych. Lezje mają zwykle kształt okrągły bądź owalny, ze skierowanymi w stronę naczyń krwionośnych wypustkami przypominającymi palce (palce Dawsona) (Noseworthy i wsp. 2000). Wiadomo, że w przebiegu SM, we wczesnym etapie rozwoju choroby, pojawia się również zanik istoty szarej, która może wręcz wyprzedzać powstanie lezji w obrębie istoty białej (Ellwardt i Zipp 2014).

Powstanie pierwszych zmian patologicznych w OUN poprzedza uczulenie układu odpornościowego na własne antygeny mielinowe.

1.5.1. Aktywacja komórek układu odpornościowego specyficznych dla antygenów mielinowych

Do „uczulenia” układu odpornościowego na własne antygeny mieliny dochodzi w podobny sposób, bez względu na to czy antygeny te pojawiły się w wyniku uwolnienia ich z OUN (zgodnie z teorią neuronalną), czy też w wyniku reakcji krzyżowej na antygeny czynników patogennych (teoria immunologiczna).

W procesie „uczulenia” limfocytów na antygeny mielinowe biorą udział komórki prezentujące antygen (np. komórki dendrytyczne). Komórki te po kontakcie z antygenem mielinowym dojrzewają, a następnie przemieszczają się do węzłów chłonnych, gdzie prezentują antygeny naiwnym limfocytom T. Aby limfocyty T zostały aktywowane, prezentacja antygeny musi odbyć się w kontekście MHC II oraz musi zaistnieć sygnał kostymulujący w postaci interakcji pomiędzy receptorem CD80 (ang. cluster of differentiation) i CD86 na komórce dendrytycznej a CD28 na limfocycie T. Aktywowane limfocyty TCD4⁺ różnicują się w dojrzałe limfocyty efektorowe, w zależności od profilu cytokin w środowisku, w podgrupę Th1 (ang. T helper, limfocyt T pomocniczy), lub/i Th17. Celem autoreaktywnych komórek odpornościowych jest oligodendrocyt odpowiedzialny za wytwarzanie osłonki mielinowej wokół aksonu (Chastain i wsp. 2011).

Uczulenie układu odpornościowego zachodzi w największym stopniu w stosunku do glikoproteiny oligodendrocytarnej (ang. myelin-oligodendrocyte glycoprotein, MOG), zasadowego białka mieliny (ang. myelin basic protein, MBP), glikoproteiny związanej z mieliną (ang. myelin associated glycoprotein MAG) oraz w stosunku do białka proteolipidu (ang. proteolipid protein, PLP), stanowiących białkowy komponent mieliny.

Autoreaktywne limfocyty docierają do naczyń krwionośnych OUN, skąd przenikają do tkanki mózgowej poprzez rozszczelnioną barierę krew-mózg (ang. blood-brain barrier, BBB), tworząc wraz z makrofagami i komórkami plazmatycznymi nacieki zapalne wokół małych naczyń żylnych.

Po przeniknięciu do OUN komórki układu odpornościowego atakują i niszczą mielinę. Następuje degeneracja oligodendrocytów, aksony pozbawione osłonki mielinowej obumierają, czego objawem są postępujące deficyty neurologiczne.

1.5.2. Komponent neuronalny w SM

Główną przyczyną odwracalnego obniżenia sprawności w trakcie nawrotów choroby jest upośledzenie przekąźnictwa neuronalnego. Przyczynami upośledzenia przekąźnictwa w OUN jest demielinizacja aksonów, a w jej wyniku niedobór kanałów sodowych, które normalnie zlokalizowane są w przewężeniach Ranviera zmielinizowanych aksonów. Liczba tych kanałów jest niewystarczająca do utrzymania przewodnictwa wzdłuż pozbawionego mieliny aksonu. Dopiero po redystrybucji kanałów sodowych z przewężeń Ranviera oraz włączeniu w błonę nowych kanałów wzdłuż zdemielinizowanego aksonu następuje odzyskanie przewodnictwa (Smith 2007). W proces hamowania przekąźnictwa wzdłuż aksonu zaangażowanych jest wiele czynników zapalnych, jak również tlenek azotu (NO) (Redford i wsp. 1997).

Ostre uszkodzenie zachodzi w największym stopniu w aktywnie demielinizowanych aksonach. Uszkodzenia te powstają w trakcie demielinizacji jak również zaraz po zniszczeniu mieliny. Dodatkowo następuje powolne uszkodzenie aksonów w nieaktywnych lezjach. Uszkodzenie aksonów może rozprzestrzeniać się z obrębu lezji do istoty białej, która nie uległa zmianom patologicznym (Kornek i wsp. 2000; Kutzelnigg i wsp. 2005).

Znaczny wzrost zapotrzebowania energetycznego w zdemielinizowanych aksonach, w których nastąpiła redystrybucja kanałów sodowych, sugeruje ważną rolę mitochondriów w postępującym uszkodzeniu. Deficyty mitochondrialne mogą powodować dysfunkcję oraz

uszkodzenia aksonów w wyniku niedoboru adenozyntrójfosforanu (ang. adenosine triphosphate, ATP), zaburzeń homeostazy jonów wapniowych oraz wzrostu produkcji wolnych rodników (Mahad i wsp. 2008).

1.6. Leki stosowane w terapii stwardnienia rozsianego

Standardowe terapie chorych na SM oparte są o leczenie objawowe. W trakcie rozwoju rzutów podawane są glikokortykosteroidy. Pomiedzy rzutami stosowane są leki modyfikujące przebieg choroby. Zmniejszają one częstość rzutów choroby, obniżają ich siłę oraz spowolniają postęp choroby, niestety nie są w stanie trwale jej zatrzymać. Leki używane obecnie w terapii SM, oraz te będące dopiero w badaniach klinicznych, opierają się na kilku różniących się mechanizmach działania.

1.6.1. Leki immunomodulujące

Leki immunomodulujące, na przykład interferon β (IFN- β), glatiramer czy dimetylofumaryna (BG12) są najpowszechniej stosowaną grupą leków.

IFN- β wpływa na układ immunologiczny poprzez działanie na specyficzne receptory. Hamuje aktywację limfocytów T, wpływa na poziom cytokin pro- i anty-zapalnych (Luessi i wsp. 2012), redukuje migrację monocytów i limfocytów Th1 (ale nie Th2) przez ludzki śródbłonek naczyń mózgowych. IFN- β stabilizuje również przepuszczalność BBB oraz przechodzenie przez nią rozpuszczalnych substancji (Prat i Antel 2005). Lek ten redukuje ilość rzutów choroby o 30% oraz hamuje rozwój nowych ognisk zapalno-demielinizacyjnych o 65% (Rudick i Goelz 2011). Skuteczność tego leku jest jednak ograniczona i obarczona dużą ilością działań niepożądanych.

Glatiramer (GA) jest to preparat mający działanie przeciwzapalne (Aharoni i wsp. 2002). Jest to mieszanina syntetycznych peptydów zbudowanych z czterech aminokwasów (L-kwasu glutaminowego, L-lizyny, L-alaniny, L-tyrozyny), które przypominają białko MBP. Lek ten powoduje „przełączenie się” odpowiedzi immunologicznej przebiegającej z udziałem limfocytów Th1 na limfocyty Th2, które wykazują funkcje przeciwzapalne. Glatiramer powoduje również zahamowanie proliferacji i aktywacji limfocytów T oraz ich apoptozę (Luessi i wsp. 2012). GA z wysokim powinowactwem wiąże się z białkami MHC, konkurując z

antygenami mieliny w tym procesie. Powoduje to zahamowanie MBP-specyficznych komórek T, poprzez częściowe pobudzenie receptora limfocytów T (TCR, ang. T cell Receptor). Stymuluje on również migrację komórek typu Th2 przez barierę krew-mózg oraz może mieć efekt neuroprotekcyny, poprzez zwiększenie wydzielania BDNF (ang. brain-derived neurotrophic factor) (Ruggieri i wsp. 2007). Lek ten, wiążąc się z MHC II, indukuje limfocyty T regulatorowe i hamuje limfocyty T efektorowe, co redukuje odpowiedź zapalną. Skuteczność glatirameru w redukcji nawrotów SM szacuje się na 29%.

Dwumetylofumaran, (ang. dimethyl fumarate, BG-12) wpływa na potencjał oksydacyjno-redukcyjny w komórkach poprzez zwiększenie poziomu zredukowanego glutationu. Lek ma właściwości neuroprotekcjne, które wynikają z hamowania przemieszczania się do jądra komórkowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell), co powoduje obniżenie ekspresji kontrolowanych przez ten czynnik genów związanych ze stanem zapalnym. Lek ten może powodować również „przełączenie” odpowiedzi Th1 na Th2, zwiększając tym samym produkcję cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-4 czy IL-5 (Ruggieri i wsp. 2007). Skutki uboczne tego doustnego leku to: objawy ze strony układu pokarmowego, rumień, białkomocz. Został on zaaprobowany w marcu 2013 roku przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. Food and Drug Administration) a przez Europejską Agencję Leków (EMA, ang. European Medicines Agency) w lutym 2014 roku (Tanasescu i wsp. 2014).

Natalizumab to przeciwciało monoklonalne przeciwko podjednostce α 4 (CD49d) integryny (α 4 β 1 i α 4 β 7). Integryna α 4 β 1 jest białkiem, które posiadają wszystkie leukocyty z wyjątkiem neutrofilii, bierze ono udział w przyleganiu leukocytów do komórek endotelialnych. Natalizumab, łącząc się z integryną, hamuje migrację leukocytów przez BBB oraz przez komórki endotelium naczyń jelita. Niestety lek ten może być przyczyną wystąpienia postępującej wieloogniskowej leukoencefalopatii (ang. progressive multifocal leukoencephalopathy, PML). PML jest wywoływana przez infekcję wirusem Johna Cunninghama (ang. John Cunningham virus, JCV), który powszechnie występuje w populacji ludzkiej i nie wywołuje konsekwencji u 60-80% populacji światowej. Jednakże w przypadku niedoboru funkcjonalnego komórek CD4+ w mózgu może rozwinąć się PML (Planas i wsp. 2014).

Fingolimod natomiast wpływa na działanie receptora 1-fosfosfingozyny (ang. sphingosine 1-phosphate receptor, S1PR). W układzie odpornościowym fingolimod powoduje wyciszenie ścieżki sygnałowej receptora S1P1 w limfocytach, co powoduje zahamowanie migracji limfocytów z węzłów chłonnych. Efekt ten jest ograniczony do komórek naiwnych oraz limfocytów pamięci T oraz B, nie dotyczy zaś komórek efektorowych pamięci T. Badania *in vitro* wykazały, że fingolimod może również promować przetrwanie prekursorów oligodendrocytów oraz ich aktywację, a także może hamować aktywację astrocytów. Skutkami ubocznymi terapii fingolimodem może być zwiększenie częstości infekcji herpeswirusem oraz zwiększenie ryzyka rozwoju nowotworów skóry. Rzadziej pojawia się łagodne nadciśnienie, wzrost poziomu enzymów wątrobowych oraz występuje ryzyko bradykardii w okresie do 6 h po pierwszym podaniu (Tanasescu i wsp. 2014).

Innymi lekami immunomodulującymi są: laquinimod, alemtuzumab, daclizumab, rituximab, ocrelizumab.

1.6.2. Leki cytotoksyczne

Trzecią grupą są leki oparte o działanie cytotoksyczne jak np. **mitoxantron**. Jest on inhibitorem topoizomerazy II, przez co powoduje zahamowanie syntezy DNA. Związek ten przechodzi poprzez rozszczelnioną barierę krew-mózg, powodując śmierć szybko dzielących się komórek, między innymi apoptozę komórek dendrytycznych i mikrogleju. Powoduje on także zahamowanie migracji monocytów i leukocytów. Skutki uboczne przyjmowania mitoxantronu to: nudności, łysienie, zwiększona podatność na infekcje, bezpłodność, zawały serca (jest kardiotoxyczny), nowotwory (Tanasescu i wsp. 2014).

Innym lekiem o właściwościach cytotoksycznych jest **teriflunomid**. Teriflunomid jest inhibitorem dehydrogenazy kwasu dihydroorotowego (ang. Dihydroorotate dehydrogenase, DHODH), enzymu który uczestniczy w syntezie *de novo* pirymidyn. Działanie tego leku polega głównie na hamowaniu szybko dzielących się komórek takich jak na przykład aktywowane limfocyty. Innym działaniem leku jest upośledzenie zdolności migracyjnych komórek T, co powoduje przechylenie równowagi różnicowania się naiwnych limfocytów w stronę fenotypu Th2 i zmniejszenie zależnej od komórek T produkcji przeciwciał. Skutki niepożądane jakie mogą się pojawić w trakcie leczenia teriflunomidem to: bóle brzucha, biegunka, dyspepsja, nudności, wymioty, owrzodzenie jamy ustnej, wzrost poziomu enzymów wątrobowych,

łyсение, wysypka, nadciśnienie. U pacjentów, których leczono wcześniej lekami immunosupresyjnymi, istnieje ryzyko wystąpienia PML (Tanasescu i wsp. 2014).

Pomimo wielu lat badań nad SM nie udało się do tej pory opracować terapii, która doprowadziłaby do zwalczenia choroby. Wszystkie dotychczas dostępne terapie jedynie spowalniają postęp choroby, która wcześniej czy później prowadzi do trwałej niepełnosprawności.

Skuteczność obecnie stosowanych leków nie jest w pełni zadowalająca. Ponadto wykazują one szereg poważnych skutków ubocznych. Dlatego też istnieje potrzeba poszukiwania nowych „punktów uchwytu” dla potencjalnych substancji leczniczych oraz opracowywania nowych strategii terapeutycznych.

1.7. Modele zwierzęce SM - EAE

W badaniach nad SM wykorzystuje się wiele modeli, które mają odzwierciedlać różne aspekty tej choroby. Modele te opierają się o różne gatunki zwierząt, od gryzoni po małpy (np. reżus - *Macaca mulatta*). Najbardziej popularnymi zwierzętami wykorzystywanymi jako model SM są gryzonie – myszy i szczury. Stosowane modele SM polegają zarówno na aktywnym wywoływaniu choroby (np. poprzez podanie szczepionki) jak i spontanicznym pojawianiu się objawów chorobowych. Rozwinięto również modele SM oparte o modyfikację genetyczną organizmów.

Autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego jest najczęściej wykorzystywanym zwierzęcym modelem SM. Model ten został po raz pierwszy opisany przez Riversa w 1933 roku (Weiner 2009). Od tego momentu do dzisiaj powstało wiele różnych jego odmian.

Modele EAE ze względu na sposób wywołania dzielimy na:

a) Aktywnie wywołane EAE

Jest to model pierwotnie opracowany na gryzoniach, który polega na ich immunizacji szczepionką zawierającą białka mieliny w kompletnym adiuwancie Freund'a (ang. complete Freund's adjuvant, CFA). Jednym ze sposobów jest iniekcja pełnego adiuwantu Freund'a wraz z ksenogenicznym homogenatem rdzenia kręgowego (Tsunoda i Fujinami 1996;

Kwiatkowska-Patzer i wsp. 2009), a drugim iniekcja adiuwantu Freund'a wraz z oczyszczonym białkiem MOG (Wallstrom i wsp. 1997). Efektem immunizacji jest rozwój deficytów neurologicznych, zwykle zaczynających się od niedowładu ogona, tylnych łap i postępujących do przodu ciała wzdłuż kręgosłupa. Procesowi temu towarzyszy znaczna utrata masy ciała zwierzęcia. Siła objawów może się różnić od łagodnych do letalnych, w zależności od rodzaju szczepionki, dawki oraz linii zwierząt. Objawy rozwijają się zwykle od 10 do 20 dni po immunizacji, a następnie spontanicznie zanikają. Inne modele prowadzą do rozwoju remitujących objawów, które ostatecznie przechodzą w chroniczny paraliż. Białka wykorzystywane do immunizacji to zwykle MBP, PLP i MOG, który skutecznie wywołuje EAE również u myszy, u których standardowa immunizacja nie skutkuje (np: u myszy linii C57BL/6). Model EAE można wywoływać u różnych gryzoni. Zwykle za pomocą MBP i PLP wywołuje się EAE u szczurów Lewis i Dark Aguti (DA) lub myszy SJL/J i PL/J. Immunizację białkiem MOG można wykonać ponadto u szczurów BN (ang. Brown Norway) i myszy C57BL/6 i BALB/c (Gold i wsp. 2006). Oprócz różnej wrażliwości na immunizację, zwierzęta mogą również wykazywać odmienny przebieg samej choroby. Na przykład w EAE wywołanym przy użyciu MBP u szczurów Lewis, lezje pojawiają się głównie w dolnych partiach rdzenia kręgowego, a w EAE wywołanym białkiem MOG u myszy C57BL/6 zwykle zaczynają się w nerwie wzrokowym i dopiero następnie atakują rdzeń kręgowy (Gold i wsp. 2006).

Model EAE został opracowany również na innych zwierzętach, na przykład immunizacja małpy marmozety zwyczajnej (*Callithrix jacchus*) ludzkim zrekombinowanym białkiem MOG z CFA, prowadzi do rozwoju objawów bardzo przypominających ludzkie SM (t Hart i wsp. 2000).

b) Pasywne EAE

Model EAE można wywołać nie tylko poprzez iniekcje szczepionki zawierającej antygeny mieliny. W 1960 roku Phil Paterson wykazał, że transfer komórek pobranych z węzła chłonного (najbliższego podaniu szczepionki) zwierząt chorych na EAE do zwierząt zdrowych może wywołać EAE. Za efekt ten odpowiadają komórki T CD4+, a niedawne badania wykazały, że jest to subpopulacja Th17 (Bettelli i Kuchroo 2005).

c) Modele transgeniczne

Opracowano również modele spontanicznego powstawania EAE, oparte na myszach modyfikowanych genetycznie. W jednym z takich modeli, myszy posiadające specyficzny dla MBP receptor limfocytów T, spontanicznie rozwijają EAE z częstością zależną od czystości mikrobiologicznej ich hodowli – czyste utrzymanie działa na nie protekcyjnie.

Inny model to myszy rozwijające spontanicznie EAE zbliżone do choroby Davic'a (podgrupa SM). Myszy te posiadają limfocyty T z receptorem specyficznym do białka MOG oraz 30% limfocytów B rozpoznających epitop MOG i wydzielających przeciwciała o takiej specyficzności (Bettelli i wsp. 2006; Krishnamoorthy i wsp. 2006).

Kolejnym modelem opartym o modyfikowane genetycznie myszy jest tzw. humanizowany EAE. Jest to model oparty o myszy transgeniczne, które posiadają ludzkie białka MHC II, HLA-DR15, CD4 oraz ludzki receptor limfocytów T specyficzny dla MBP. 5% takich myszy spontanicznie rozwija EAE (Wekerle i Kurschus 2006).

Modele EAE są szeroko stosowane w badaniach nad patomechanizmami choroby oraz przy projektowaniu leków np.: glatirameru (Aharoni i wsp. 2002), mitoxantronu (Ridge i wsp. 1985), natalizumabu (Yednock i wsp. 1992).

1.8. Badania patomechanizmów EAE

Badania na modelu EAE pozwoliły na zgłębienie mechanizmów procesów patologicznych zachodzących w trakcie rozwoju choroby.

1.8.1. Rozszczelnienie bariery krew-mózg

Bariera krew-mózg znajduje się anatomicznie na poziomie mikronaczyń mózgowych. Składowe morfologiczne bariery stanowią komórki endotelium, błona podstawna, pericyty oraz astrocyty (stopki astrocytarne otaczają mikronaczynia). Elementy te wraz z przyległymi neuronami tworzą tak zwaną jednostkę nerwowo-naczyniową (ang. neurovascular unit) (Ryc. 1). W warunkach fizjologicznych BBB umożliwia sprawny transport substancji niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania OUN oraz chroni go przed negatywnym wpływem substancji znajdujących się w układzie krwionośnym (Persidsky i wsp. 2006).

Jednym z najważniejszych elementów BBB są komórki endotelialne, stanowiące główną barierę pomiędzy krwią a układem nerwowym. Spełniają one swoją funkcję między

innymi dzięki tzw. połączeniom ścisłym występującym pomiędzy tymi komórkami (ang. tight junctions). Połączenia ścisłe zbudowane są z szeregu specyficznych białek takich jak: kładyny -3, -5, okładyny, ZO-1, -2, -3 (łac. zonula occludens), cinguliny, AF6 i 7H6 (Ryc. 2). Oprócz białek połączeń ścisłych, do białek łączących komórki endotelium należą również białka przylegania komórkowego takie jak kadheryny. Obecność połączeń ścisłych pomiędzy komórkami endotelium wymusza przenikanie większości substancji do OUN przez system transportowy endotelium. Charakterystyczna dla komórek endotelium w obrębie OUN jest duża liczba mitochondriów, związana z dużym zapotrzebowaniem energetycznym wynikającym z ich funkcji transportowej, niewielka ilość pęcherzyków pinocytarnych, a także wysoka ekspresja enzymów tworzących tak zwaną barierę enzymatyczną zdolną do rozkładania niektórych leków oraz substancji neuroaktywnych (Persidsky i wsp. 2006).

Pericyty są komórkami przynaczyniowymi leżącymi po abluminalnej stronie mikronaczynia. Posiadają wypustki cytoplazmatyczne, które pokrywają 20-30% powierzchni mikronaczyń. Pericyty regulują proliferację komórek endotelialnych, ich przeżycie, migrację i różnicowanie oraz rozgałęzianie się mikronaczyń (Lai i Kuo 2005). Część pericytów pochodzenia makrofagowego może brać udział w procesie fagocytozy i prezentowania antygenów (Williams i wsp. 2001). Komórki te komunikują się bezpośrednio z komórkami endotelium poprzez połączenia szczelinowe (Lai i Kuo 2005). Pericyty w stanach patologicznych jak np. hipoksja (Gonul i wsp. 2002), czy uszkodzenie mechaniczne (Dore-Duffy i wsp. 2000) mogą migrować z obrębu naczyń krwionośnych do otaczających tkanek, co może zmieniać przepuszczalność BBB (Persidsky i wsp. 2006).

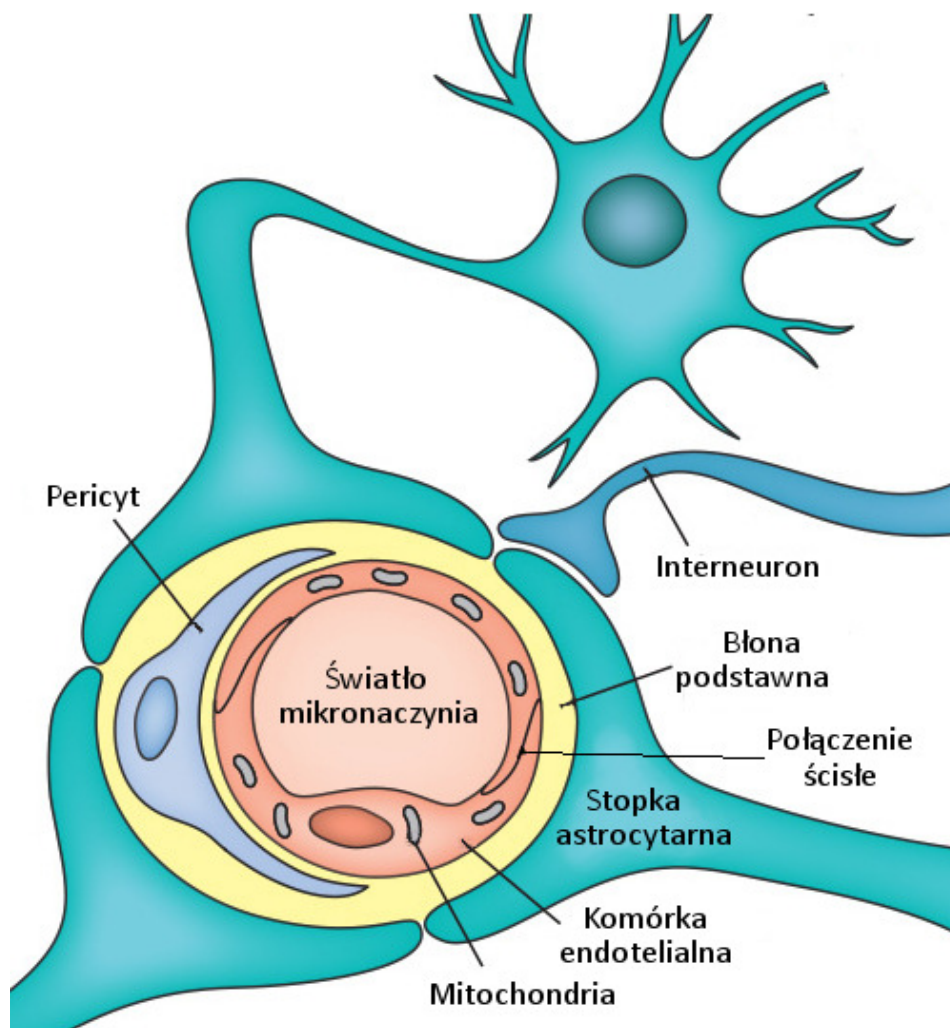
Zakończenia wypustek astrocytów, tak zwane stopki astrocytarne, pokrywają 99% powierzchni mikronaczyń. Astrocyty i komórki endotelialne oddziałują na siebie wzajemnie i interakcje te są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania jednostki nerwowo-naczyniowej (Persidsky i wsp. 2006).

Astrocyty mogą również modulować przepuszczalność BBB w stanach patologicznych poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych takich jak: IL-6, TNF- α , IL-1 β , TGF- β (ang. Transforming Growth Factor β , transformujący czynnik wzrostu β) (Schwaninger i wsp. 1999; Didier i wsp. 2003).

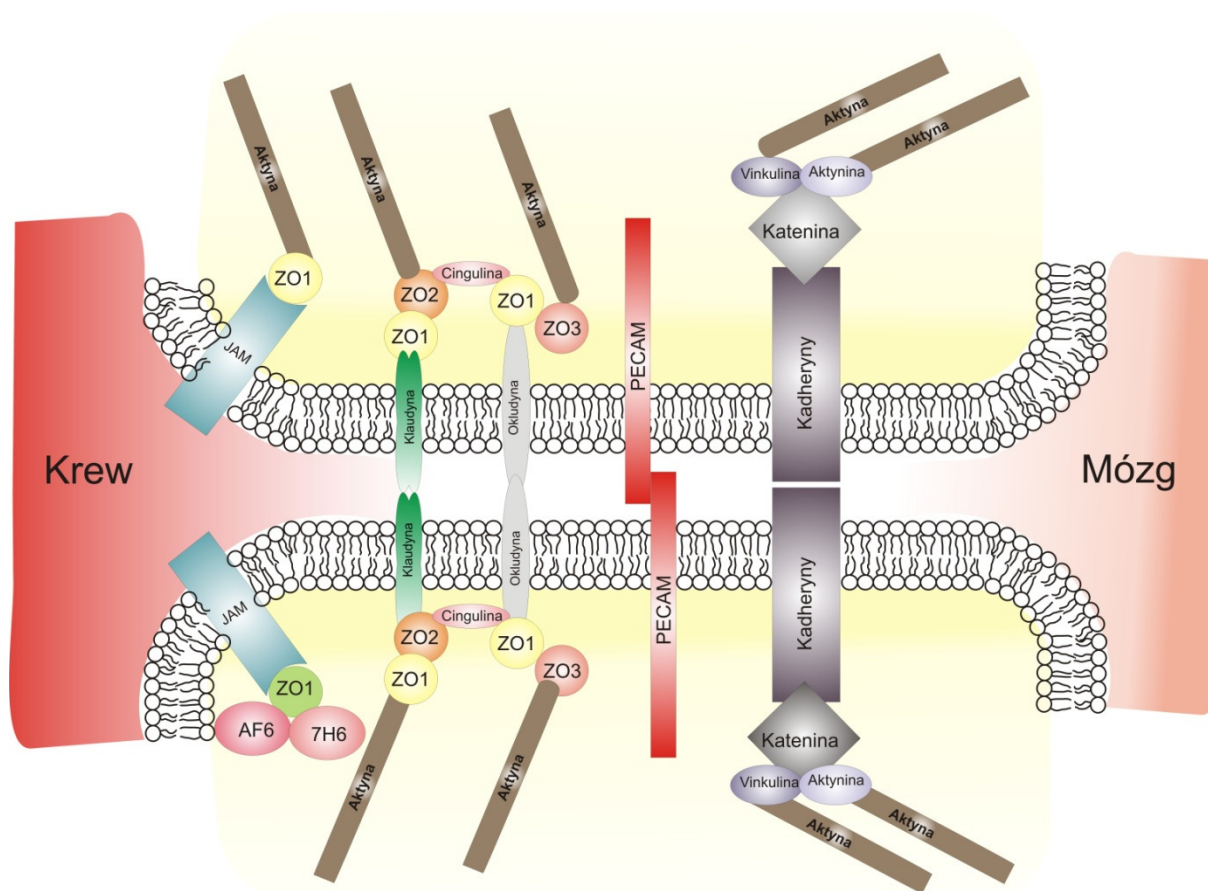
Neurony unerwiają mikronaczynia OUN i regulują ich funkcje (Persidsky i wsp. 2006). Szacuje się, że każdy neuron w ludzkim mózgu posiada swoje własne naczynie włosowate. Wiadomo że naczynia włosowate są unerwione przez różnego rodzaju neurony takie jak np.:

noradrenergiczne, serotonergiczne, cholinergiczne i GABA-egiczne. Obecność neuronów w modelu BBB *in vitro* zmniejsza przepuszczalność BBB, co wskazuje na ich istotną rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania BBB (Sa-Pereira i wsp. 2012).

W stanach patologicznych komórki układu odpornościowego mogą przenikać z obwodu do OUN, wywołując stan zapalny. Limfocyty najpierw toczą się, a następnie zatrzymują na ścianie mikronaczynia. W procesie tym ważną rolę odgrywają białka obecne na endotelium oraz na limfocytach, odpowiednio: P-selektyna/ligand glikoproteinowy dla P-selektyny 1 (ang. P-selectin glycoprotein ligand, PSGL-1) oraz VCAM-1 (cząsteczka adhezji komórkowej naczyń, ang. vascular cell adhesion molecule 1)/ α 4-integryna. Gdy aktywowane limfocyty zetkną się z powierzchnią mikronaczynia, przemieszczają się wzdłuż niego i przenikają poprzez cytoplazmę endotelium, bądź w miejscu rozluźnionych połączeń ścisłych (Lyck i Engelhardt 2012). Komórki endotelialne, po rozpoznaniu komórek odpornościowych, tworzą w błonie zagłębienia bogate w ICAM-1 (międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1, ang. Intercellular adhesion molecule 1) oraz VCAM-1, umożliwiając przejście limfocytom przez ciało komórki (Carman i Springer 2004). W modelu EAE wykazano, że również astrocyty przynaczyniowe posiadają na swojej powierzchni białko VCAM-1, co może być istotne dla przenikania limfocytów poprzez BBB (Gimenez i wsp. 2004). Limfocyty mogą również przenikać przez BBB do OUN w stanie fizjologicznym (Zlokovic 2008; Ellwardt i Zipp 2014).



Rycina 1. Schematyczna budowa jednostki nerwowo-naczyniowej (według: <http://www.scifx.com/ScientificArt.html> - częściowo zmodyfikowany).



Rycina 2. Schematyczna budowa połączenia ścisłego (ang. tight junction) pomiędzy komórkami endotelialnymi mikronaczynia mózgowego. Widoczne białka połączeń ścisłych– klaudyna (3 i 5) oraz okcludyna wraz z wewnątrzkomórkowymi białkami ZO1, 2 i 3 oraz cinguliną. Klaudyna oraz okcludyna łączą się z cytoszkieletem aktynowym za pośrednictwem ZO2 i ZO3. Oprócz białek składowych połączenia ścisłego, w budowę BBB zaangażowane są również białka przylegania komórkowego takie jak: JAM (ang. junctional adhesion molecule), PECAM (płytkowa/endotelialna cząsteczka adhezji komórkowej, ang. platelet endothelial cell adhesion molecule), kadheryny. Białka JAM mogą działać jako białka przylegania komórkowego dla leukocytów (wg: Abbott i wsp. 2010).

1.8.2. Rola astrocytów w rozwoju SM/EAE

Powstawanie lezji jest skomplikowanym procesem, w który zaangażowane są wszystkie populacje komórek OUN. Komórki układu odpornościowego, po przekroczeniu BBB i wnikięciu do tkanki nerwowej, wchodzi w interakcje z komórkami OUN. Jedną z ważniejszych puli komórkowych, z którą oddziałują, są astrocyty.

Astrocyty zostały po raz pierwszy zidentyfikowane przez Camillo Golgiego w 1871 roku. W OUN pełnią szereg istotnych funkcji m.in.: stanowią rusztowanie dla komórek nerwowych, utrzymują lokalną homeostazę jonową i pH, magazynują glikogen, usuwają metabolity neuronów oraz uwolnione przez nie neuroprzekaźniki (np. glutaminian)

(Nedergaard i wsp. 2003; Brown i Ransom 2007). Astrocyty są również komórkami zdolnymi do komunikacji z neuronami oraz z innymi komórkami gwałowymi. Wypustki astrocytów otaczają połączenia synaptyczne, tworząc tzw. synapsę trójdziałną, w której moduluje przesłanie sygnału. Pomiedzy sobą, a także z oligodendrocytami, astrocyty komunikują się za pomocą połączeń szczelinowych (ang. gap junctions) (Rash i wsp. 2001). Stopki astrocytów otaczających mózgowe naczynia włosowate stanowią element wspomnianej wyżej jednostki nerwowo-naczyniowej, wpływając na integralność i funkcję BBB.

W trakcie rozwoju SM/EAE obserwuje się reaktywne astrocyty w obszarach demielinizacji, zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej oraz rozwój blizny astrocytarnej. Tkanka w obrębie blizny ma zmienioną budowę oraz mikrośrodowisko, które hamuje regenerację aksonów. Aktywacji astrocytów towarzyszy hipertrofia oraz wzmożona synteza gwałowego kwaśnego białka włókienkowego (ang. glial fibrillary acidic protein, GFAP). Ekspresja markerów astrocytarnych może się różnić w zależności od rejonu mózgu, w którym następuje zmiana patologiczna w tkance oraz od odległości astrocytów od miejsca uszkodzenia tkanki (Holley i wsp. 2003).

Za główny marker astrocytów uważa się GFAP. Ulega ono zwiększonej ekspresji w wyniku aktywacji astrocytów w procesie zwanym gliozą (astrogliozą), występującą w wielu stanach patologicznych w OUN. Nie jest to jednakże marker wysoce swoisty. Białko GFAP może również występować w komórkach prekursorowych oligodendrocytów (Menn i wsp. 2006), nie mielinizujących komórkach Schwanna, komórkach trzustki i komórkach gwałowych układu nerwowego przewodu pokarmowego (ang. enteric nervous system) (von Boyen i wsp. 2004). Innym białkiem uważanym za charakterystyczne dla astrocytów jest S100 β (występuje również w komórkach Schwanna, adipocytach, chondrocytach) (Nair i wsp. 2008). Wskaźnikiem aktywacji astrocytów jest również wzrost ekspresji vimentyny oraz pojawienie się nestyny (Ridet i wsp. 1997). W niniejszej pracy jako markerów astrocytarnych użyto GFAP oraz S100 β , a wzrost ekspresji tych białek uznany został za wskaźnik aktywacji astrogleju.

Aktywacja astrocytów wiąże się również ze zmianami w ekspresji cząsteczek adhezyjnych, białek prezentujących antygeny, cytokin, czynników wzrostowych, receptorów, enzymów oraz inhibitorów proteaz (Williams i wsp. 2007).

1.8.3. Interakcje astrocytów z komórkami układu odpornościowego w przebiegu SM/EAE

Astrocyty stanowią ważny element regulujący działanie układu odpornościowego w OUN. Wpływają one zarówno bezpośrednio jak i pośrednio na funkcjonowanie komórek układu odpornościowego po ich wniknięciu do tkanki nerwowej. Komórki te wydzielają szereg chemokin oraz mogą posiadać na swej powierzchni białka przylegania komórkowego takie jak ICAM-1 oraz VCAM. Z badań *in vitro* wynika, że pod wpływem działania IFN- γ , astrocyty syntetyzują MHC II, dzięki czemu mają zdolność prezentowania antygenów, m.in. antygenów mieliny. Nie jest pewne czy prezentacja antygenów w kontekście MHC II przez astrocyty zachodzi *in vivo* (Nair i wsp. 2008).

Wśród wielu cytokin astrocyty wydzielają m.in. TNF- α oraz limfotoksynę α (Lt- α). Obie te cytokiny związane są z patogenezą SM (Selmaj i wsp. 1991), powodując napływ komórek odpornościowych w obręb miejsca uszkodzenia tkanki. Białko TNF- α oraz jego mRNA zostały znalezione w obszarach gdzie zachodzi demielinizacja oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na SM (Franciotta i wsp. 1999). Co więcej, myszy z nadekspresją TNF- α wykazują spontaniczną demielinizację (Akassoglou i wsp. 1998), co sugeruje znaczący udział tej cytokiny w patogenezie choroby. W badaniach nad wykorzystaniem inhibitorów TNF- α w leczeniu SM wykazano jednak brak wpływu lub nawet pogorszenie się objawów SM (Lenercept 1999). Z kolei myszy pozbawione genu dla Lt- α wykazywały opóźnienie w demielinizacji wywołanej podaniem kuprizonu z normalnym przebiegiem remielinizacji, co może wskazywać na udział tej cytokiny wyłącznie w procesie demielinizacji (Plant i wsp. 2005).

Astrocyty syntetyzują również czynnik BAFF (ang. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family) niezbędny dla rozwoju i przeżycia limfocytów B oraz produkcji immunoglobulin. W aktywnych i chronicznych lezjach u chorych na SM jego ekspresja ulega silnemu wzrostowi (Krumbholz i wsp. 2005).

W tkance mózgowej migracja komórek odpornościowych jest regulowana przez trzy główne chemoatraktanty: MCP-1 (białko chemotaktyczne monocytów 1, ang. monocyte chemoattractant protein 1), CX3CL1 (ang. C-X3-C motif chemokine ligand 1) oraz CXCL12 (ang. C-X-C motif chemokine ligand 12). Wszystkie te trzy chemokiny kierują komórki układu odpornościowego do miejsca stanu zapalnego i mogą być produkowane przez astrocyty w

trakcie rozwoju choroby (Ransohoff i wsp. 1993; Van Der Voorn i wsp. 1999; Fischer i wsp. 2000; Sunnemark i wsp. 2005; Calderon i wsp. 2006; Krumbholz i wsp. 2006).

Astrocyty wytwarzają również duże ilości syntazy tlenu azotu, a produkty tego enzymu - tlenek azotu oraz wolne rodniki tlenowe mogą bezpośrednio uszkadzać mielinę, oligodendrocyty oraz aksony (Smith i wsp. 1999).

1.9. Receptory purynergiczne

Receptor P2X7 należy do rodziny receptorów purynergicznych. Receptory te, odkryte w 1978 roku, zostały podzielone na dwie grupy: receptory dla adenozyliny (P1) i receptory dla ATP (P2). Grupa receptorów P2 zawiera receptory metabotropowe P2Y oraz jonotropowe P2X. Obecnie znamy 8 podtypów receptorów P2Y (1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) oraz 7 podtypów receptorów P2X (1-7). Receptory P2X są trimerami, a ich ligandem jest ATP. Aktywacja tych receptorów powoduje gwałtowny, nieselektywny przepływ jonów (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), czego efektem jest depolaryzacja komórki. Białka te posiadają dwie domeny transbłonowe, pętlę zewnątrzkomórkową oraz C i N koniec wewnątrz komórki. Kanał tworzony przez te receptory zbudowany jest z 3 lub 6 podjednostek, w układzie nerwowym są one zwykle heteromerami (Engel i wsp. 2012).

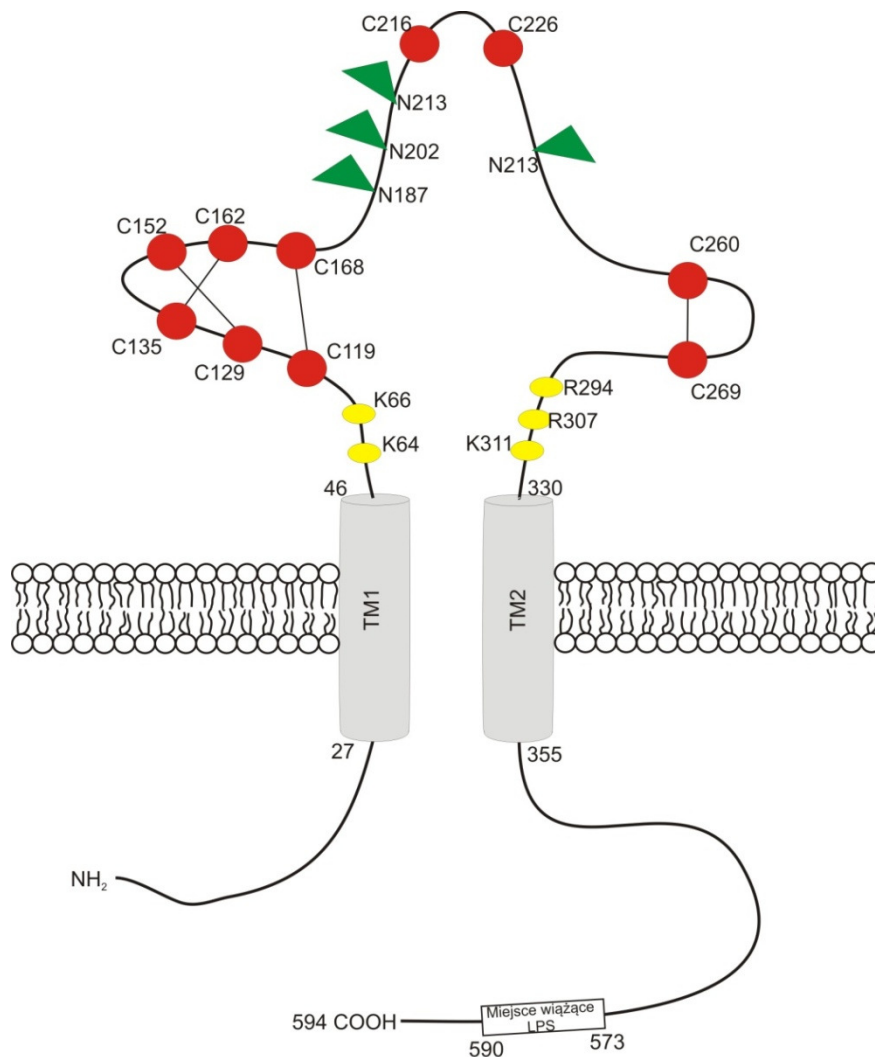
1.10. Receptor P2X7

W ostatnich latach uwaga badaczy skupia się na receptorach purynergicznych jako ważnym ogniwie w procesach zapalnych i neurodegeneracyjnych. Jednym z najciekawszych członków rodziny receptorów purynergicznych jest białko P2X7. P2X7R posiada 35-40% homologii z pozostałymi białkami z grupy P2X (Sperlagh i wsp. 2006), a pomiędzy ludzkim i szczurzym białkiem P2X7R jest 80% homologii (Cheewatrakoolpong i wsp. 2005). Jest to receptor jonotropowy, którego naturalnym ligandem jest ATP. Występuje on dość powszechnie w układzie nerwowym, zarówno na komórkach nerwowych jak i komórkach glejowych (Sperlagh i wsp. 2006).

1.10.1. Budowa białka P2X7R

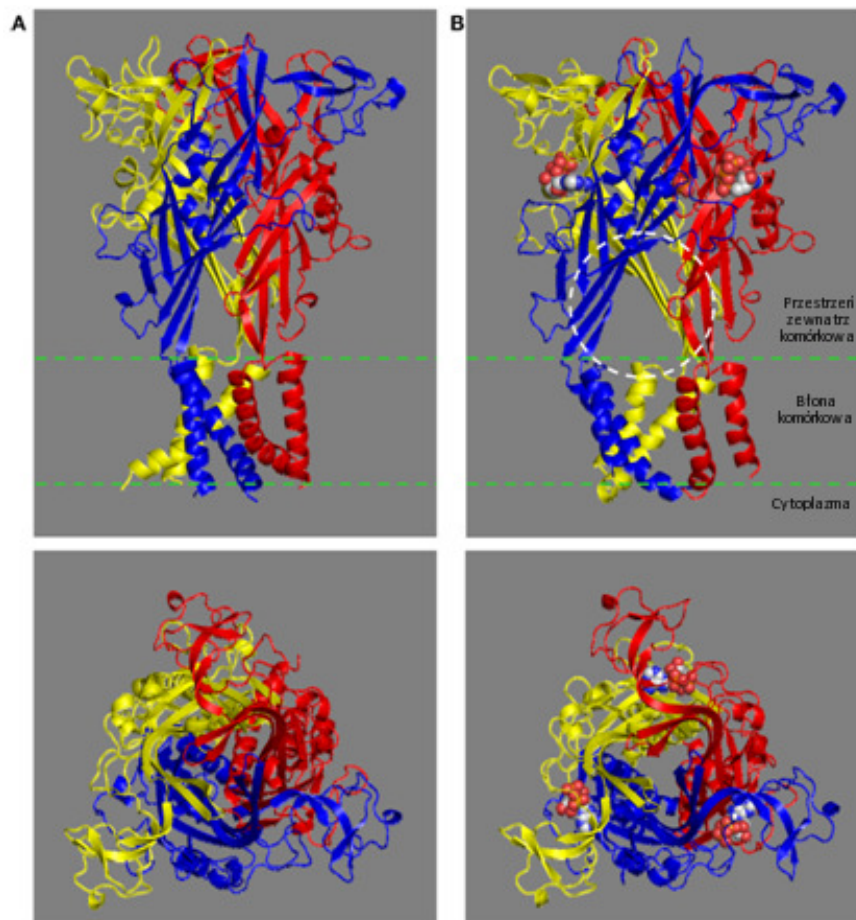
Gen kodujący P2X7R w ludzkim genomie znajduje się na chromosomie 12 q24, posiada on 53733 par zasad i zbudowany jest z 13 eksonów. Udało się zidentyfikować do tej pory 10 form splicingowych różniących się miejscem startu i końca transkrypcji oraz

posiadanyimi eksonami. Oznaczone są one literami A-H oraz J i K (Cheewatrakoolpong i wsp. 2005; Feng i wsp. 2006; Nicke i wsp. 2009; Adinolfi i wsp. 2010). W obrębie ludzkiego genu P2X7R wykryto szereg polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. Single nucleotide polymorphism, SNP) oraz powiązano je z występowaniem zaburzeń nastroju oraz podatnością na wewnątrzkomórkowe patogeny takie jak prątki gruźlicy (Fuller i wsp. 2009).



Rycina 3. Schemat budowy receptora P2X7. Czerwone kółka oznaczają cysteiny tworzące mostki dwusiarczkowe, linie pomiędzy miejscami wskazują pary cystein tworzące mostki dwusiarczkowe. Zielone trójkąty oznaczają miejsca glikozylacji, żółte owale wskazują aminokwasy biorące udział w wiązaniu ATP, szare cylindry – domeny transbłonowe TM1 i TM2. Biały prostokąt oznacza miejsce wiązania dla lipopolisacharydu (LPS) (wg: Schwarz i wsp. 2012; Jiang i wsp. 2013).

Białko P2X7R posiada 595 aminokwasów, zbudowane jest z dwóch domen trans błonowych (TM1 i TM2), dużej zewnętrzkomórkowej pętli oraz wewnątrzkomórkowych końców (**Rycina 3**). Wewnątrzkomórkowy koniec C w białku P2X7R jest dużo dłuższy niż u innych białek z rodziny P2X (239 do 27-129 aminokwasów) i zawiera kilka domen mogących oddziaływać z innymi białkami (Surprenant i wsp. 1996). Koniec ten odpowiedzialny jest również za oligomeryzację i tworzenie się poru błonowego (Surprenant i wsp. 1996; Adriouch i wsp. 2002), jak również zawiera miejsce wiązania dla lipopolisacharydu (LPS) (Denlinger i wsp. 2001). Na zewnętrzkomórkowej pętli receptora zlokalizowane są dwa miejsca wiązania dla ATP o wysokim powinowactwie (4 μ M), oraz dwa o niskim (200 μ M) powinowactwie (Klapperstuck i wsp. 2001). Miejsca te występują w obrębie struktury sześcioniciowej β -kartki oraz w sąsiedztwie regionu bogatego w cysteiny (Freist i wsp. 1998). Przekazywanie sygnału przy niskim poziomie ATP zależy od końców N oraz C, natomiast sygnał związany z wysokim stężeniem ATP zależy od końca C (Haanes i wsp. 2012).



Rycina 4. Model przestrzenny zewnętrznych oraz transbłonowych domen homotrimeru P2X7R. Górna część panelu przedstawia widok z boku, dolna część panelu widok z góry. A) Stan zamknięty. B) Stan otwarty, po przyłączeniu ATP (wg: Jiang i wsp. 2013)

P2X7R ulega modyfikacjom posttranslacyjnym takim jak między innymi: glikozylacja czy fosforylacja/defosforylacja. W obrębie zewnątrzkomórkowej pętli znajdują się reszty asparagianu, które mogą ulegać N-glikozylacji (North 2002). Glikozylacja zewnątrzkomórkowej pętli powoduje zwiększenie masy cząsteczkowej białka z 67 kDa do 79 kDa (Kim i wsp. 2001). Aktywacja receptora prowadzi do defosforylacji tyrozyny 343, co jest potrzebne do zakończenia aktywacji receptora P2X7 (zakończenia potencjału czynnościowego). W obecności inhibitorów fosfataz potencjał utrzymuje się na wysokim poziomie (Kim i wsp. 2001). Pętla zewnątrzkomórkowa zawiera 10 konserwowanych ewolucyjnie cystein które tworzą między sobą mostki dwusiarczkowe (Clyne i wsp. 2002; Schwarz i wsp. 2012).

P2X7R może oligomeryzować tworząc homooligomery, nie tworzy natomiast heteromerów z innymi białkami z rodziny P2X (Torres i wsp. 1999). Oligomeryzacja prowadzi do utworzenia heksamerów i trimerów w obwodowych makrofagach. Białko to może pozostawać również jako monomer w komórkach mikrogleju (Kim i wsp. 2001). Rycina 4 przedstawia model przestrzenny trimera P2X7R.

P2X7R poprzez C-koniec może wchodzić w interakcje z innymi białkami. Analiza proteomiczna wykazała, że są to: laminina $\alpha 3$, integryna $\beta 2$, β aktyna, supervillina, MAGuK, białka szoku cieplnego (Hsp90, Hsc71, Hsp70), kinaza fosfatydyloinozytolu 4 (PI4K), receptor białkowej fosfatazy tyrozynowej β (RPTP β) (Kim i wsp. 2001).

1.10.2. Lokalizacja P2X7R w ośrodkowym układzie nerwowym

Ekspresję mRNA dla P2X7R wykryto zarówno w neuronach jak i w gleju, w takich strukturach OUN jak: kora, prążkowie, pień mózgu, jądro półleżące, mózdzek oraz hipokamp (Franke i wsp. 2001; Sperlagh i wsp. 2002; Hervas i wsp. 2005). Badania na myszach posiadających w jednej ramce odczytu z P2X7R białko wzmocnionej zielonej fluorescencji (ang. enhanced green fluorescent protein, eGFP) ze wspólnym startem oraz końcem transkrypcji, potwierdziły ekspresję P2X7R w neuronach i gleju. W badaniach elektrofizjologicznych *in vitro* wykazano natomiast obecność aktywnego P2X7R na astrocytach izolowanych z hipokampów szczurzych zarodków i oseków. Natomiast nie obserwowano aktywności P2X7R na neuronach (Rubini i wsp. 2014). U szczurów dorosłych

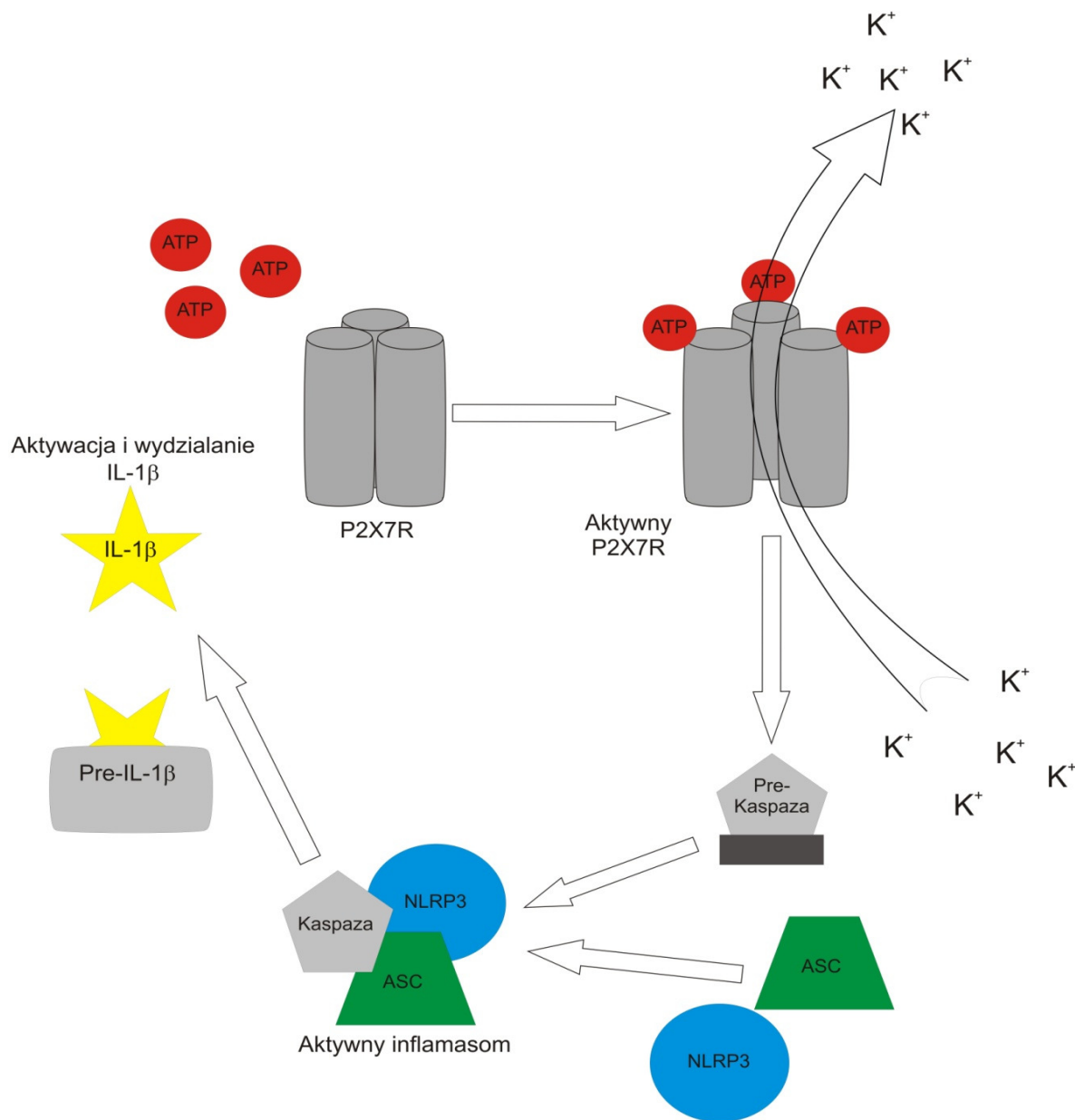
obecność białka P2X7R w obrębie OUN została wykazana zarówno w puli neuronalnej jak i astrocytarnej (Grygorowicz i wsp. 2010; Grygorowicz i wsp. 2011).

W obrębie komórki białko to było wykrywane głównie w błonie komórkowej, ale również w retikulum endoplazmatycznym, gdzie zachodzą procesy jego dojrzewania, między innymi glikozylacja (Lenertz i wsp. 2010).

1.10.3. Działanie P2X7R

P2X7R charakteryzuje się ciekawymi i unikalnymi, w swojej grupie receptorów, właściwościami. Jego naturalnym agonistą jest ATP, do którego receptor posiada niskie powinowactwo (ponad 100 μ M) i jest ono najniższe w rodzinie receptorów P2X. ADP oraz AMP wykazują jeszcze niższe powinowactwo niż ATP (North 2002). Sztucznym nieselektywnym agonistą receptora jest BzATP (2',3'-O-(4-benzoylo-benzoyl)adenozyno 5'-trójfosforan) o 10-30 krotnie wyższym powinowactwie do P2X7R niż ATP. Sztuczny antagonistą P2X7R Brilliant blue G (BBG) posiada wysokie powinowactwo (10 nM) (Jiang i wsp. 2000) i przechodzi przez barierę krew-mózg, natomiast nieodwracalnym antagonistą P2X7R jest Oxy-ATP (Murgia i wsp. 1993), który posiada właściwości immunomodulujące (Beigi i wsp. 2003) i cytotoksyczne (Craighead i wsp. 2001), ale nie przechodzi przez barierę krew-mózg.

Aktywacja receptora P2X7, w zależności od jej sposobu, może powodować dwa odmienne skutki. Aktywacja poprzez przejściowe działanie niskich stężeń ATP skutkuje wydzielaniem cytokin prozapalnych takich jak np. IL-1 β . Mechanizm wydzielania IL-1 β oparty jest na aktywacji kaspazy 1 na skutek wpływu jonów potasu K⁺ przez otwarty nieselektywny kanał P2X7R (Kahlenberg i Dubyak 2004). Aktywna kaspaza 1 wchodzi w skład kompleksu białkowego zwanego inflamasomem. Aktywny inflamasom powoduje cięcie proteolityczne nieaktywnej formy IL-1 β (preIL-1 β) o masie 30-35 kDa do formy aktywnej o masie 18 kDa, a tym samym tzw. „dojrzewanie” i wydzielanie aktywnej interleukiny prozapalnej IL-1 β (Ryc. 5) (Mariathasan i wsp. 2006). P2X7R bierze również udział w wydzielaniu interleukiny 6 (Solini i wsp. 2004), IL-18 (Mariathasan i wsp. 2006), stąd też postuluje się znaczący udział tego receptora w procesie zapalnym.



Rycina 5. Schemat działania receptora P2X7 prowadzący do dojrzewania Interleukiny 1 β . Przyłączenie ATP do receptora powoduje jego aktywację i otwarcie nieselektywnego kanału jonowego. Zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowego jonów potasu (K^+) powoduje aktywację kaspazy 1. Aktywna kaspaza 1 łączy się z pozostałymi składowymi inflamasomu t.j. białkiem ASC oraz białkiem NLRP3 (NALP3). Aktywny inflamasom indukuje przejście pre-IL-1 β do postaci aktywnej cytokiny. Schemat własny.

Aktywacja P2X7R może również powodować zahamowanie aktywności kinazy syntetazy glikogenu 3 (GSK-3) (Ortega i wsp. 2009), aktywację kinazy N-końca c-Jun (1 i 2) (JNK) (Humphreys i wsp. 2000), ERC1/2, p38 MAPK, fosfolipazy A2 (PLA2) (zarówno formy zależnej od wapnia cPLA2 jak i nie zależnej od wapnia iPLA2) (Alzola i wsp. 1998) i fosfolipazy D oraz aktywację czynników transkrypcyjnych takich jak CREB, NF- κ B, AP-1 (Ortega i wsp. 2009; Skaper i wsp. 2010).

Jeżeli receptor P2X7 zostanie poddany działaniu wysokich stężeń ATP, bądź przedłużonemu wpływowi agonisty, może to powodować jego oligomeryzacji oraz powstawania poru błonowego, przepuszczalnego dla cząstek do 900 Da (Surprenant i wsp. 1996). Otwarcie poru błonowego może prowadzić do śmierci komórki poprzez zachwianie równowagi jonowej i energetycznej. Uwolniony w czasie śmierci komórki ATP może dodatkowo prowadzić do wzmożonej aktywacji sąsiednich receptorów P2X7R (Di Virgilio i wsp. 1998).

W modelu pilokarpinowym padaczki podanie antagonisty P2X7R – OxATP wykazuje protekcyjne właściwości w stosunku do astrocytów, podczas gdy podanie BzATP – agonisty P2X7R wywołuje śmierć komórek astrogleju w procesie przypominającym apoptozę (Kim i wsp. 2011).

Obserwowano również, że przejściowa aktywacja receptora P2X7 może wywoływać reakcję przypominającą apoptozę, objawiającą się depolaryzacją mitochondriów, wzrostem poziomu mitochondrialnego i cytoplazmatycznego wapnia, ekspozycją fosfatydyloseryny na powierzchni komórki, depolimeryzacją filamentów aktynowych oraz wybrzuszeń na powierzchni błony komórkowej. Niemniej, jeśli aktywacja receptora nie jest dłuższa niż 20-30 min, zmiany te są odwracalne, a apoptoza nie następuje. Dłuższa aktywacja prowadzi do uwalniania z mitochondriów cytochromu C, a następnie do apoptozy komórki (Mackenzie i wsp. 2005).

Aktywacja P2X7R może mieć właściwości promujące proliferację w komórkach limfoidalnych. Właściwości te występują w zakresie działania niskich stężeń ATP (Baricordi i wsp. 1999). Receptorowi P2X7 przypisuje się także inne funkcje, jak na przykład udział w regulowaniu poziomu endogennych kanabinoidów (eCB) (Witting i wsp. 2006).

Hamowanie szlaków sygnałowych receptorów P2, w tym receptorów P2X7, może następować poprzez hydrolizę ATP przez ekto-ATPazy, które degradują ATP do ADP, ekto-apyrazy rozkładające ATP oraz ADP do AMP oraz ekto-5'-nukleotyduazy rozkładające AMP do

adenozyny (Komoszyński i Wojtczak 1996). Przykładowymi enzymami są: E-NTPDazy (E-NTP-Dase/CD39 family), ekto-nukleotydo-fosfodiesteraza (ecto-nucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase, E-NPP1-3), 5'ektonukleotydaza (ecto-5'-nucleotidase, CD73) i alkaliczna fosfataza (Yegutkin 2008).

Dane literaturowe wskazują, że białko z rodziny paneksyn (paneksyna 1, Panx1) może brać udział, wraz z P2X7R, w powstawaniu poru błonowego i jest jego aktywną składową (Pelegriń i Surprenant 2006). Kanały paneksynowe mogą brać udział w wypływie ATP oraz glutaminianu z różnych puli komórkowych.

1.10.4. Paneksyna 1 jako składnik aktywnego receptora P2X7

Paneksyny to rodzina trzech białek do której należą: Panx1 (426 aa i 47,6 kDa); Panx2 (664 aa i 73.3 kDa) i Panx3 (392aa i 44,7 kDa) (D'Hondt i wsp. 2009). Białka te, pomimo podobnej struktury przestrzennej (MacVicar i Thompson 2010), nie posiadają homologicznej sekwencji z koneksynami (Yen i Saier 2007). Z powodu podobieństwa do białek tworzących połączenia międzykomórkowe, niektórzy autorzy uważają, że paneksyna jest składnikiem tzw. hemikanałów (dwa hemikanały tworzą połączenie międzykomórkowe).

Hemikanał tworzony przez Panx1 jest heksamerem. Ostatnie badania wykazały, że w komórkach kręgowców hemikanały nie tworzą połączeń szczelinowych (Li i wsp. 2011), gdyż dwa kanały mają małe powinowactwo do siebie, a glikozylacja zewnątrzkomórkowej domeny Panx tworzy zawadę sferyczną do łączenia się dwóch hemikanałów (MacVicar i Thompson 2010). Dlatego obecnie uważa się, że paneksyny są funkcjonalnymi kanałami błonowymi.

Białko Panx1 występuje w wielu narządach m.in.: oczach, tarczycy, prostaty, nerkach, wątrobie i OUN. W układzie nerwowym występuje w: hipokampie, korze, mózdzku, wzgórzu, podwzgórzu, w komórkach takich jak neurony (Ray i wsp. 2005; MacVicar i Thompson 2010), astrocyty oraz oligodendrocyty (Lutz i wsp. 2013). Forma Panx2 jest syntetyzowana głównie w komórkach w obrębie OUN (Dvorianchikova i wsp. 2006), a Panx3 w skórze, osteoblastach, chondrocytach (Bruzzone i wsp. 2003; Litvin i wsp. 2006). W obrębie komórki białka Panx występują głównie w błonie komórkowej, ale również w retikulum endoplazmatycznym oraz aparacie Golgiego (Penuela i wsp. 2007; Penuela i wsp. 2009).

Kanały paneksynowe mogą być zaangażowane w różnego rodzaju patologie. Zaobserwowano m.in. wzrost poziomu mRNA dla Panx1 w wyniku napadu padaczkowego (Zappala i wsp. 2006) oraz pojawienie się Panx2 w astrocytach w wyniku niedokrwienia – reperfuzji (Zappala i wsp. 2007). Myszy pozbawione Panx1 nie wykazują widocznych zaburzeń, jednakże myszy pozbawione P2X7R nie syntetyzują Panx1 (D'Hondt i wsp. 2009), co wskazuje na ścisły związek pomiędzy tymi białkami.

Kanał Panx1 bierze udział wraz z P2X7R w powstawaniu poru błonowego (Pelegri i Surprenant 2006), co wiąże się z jego udziałem w procesach śmierci komórkowej na drodze nekrozy bądź apoptozy (Locovei i wsp. 2007). Są również doniesienia łączące kanał Panx1 i P2X7R z uwalnianiem IL-1 β , aktywacją inflamasomu oraz z uwalnianiem ATP z astrocytów (Li i wsp. 2011). Blokowanie kanału Panx1 poprzez działanie specyficznym antagonistą powoduje opóźnienie pojawiania się oraz osłabienie objawów neurologicznych u myszy poddanych EAE (Lutz i wsp. 2013). Najnowsze dane sugerują, że funkcja kanałów paneksynowych jest powiązana z receptorem P2X7R i moduluje jego działanie, gdyż będąc lokalnym źródłem ATP, wzmacnia aktywność receptora (Bravo i wsp. 2015).

1.10.5. Udział P2X7R w stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego

Postuluje się udział P2X7R w patomechanizmach chorób neurodegeneracyjnych np. choroby Alzheimera. Badania na transgenicznym mysim modelu choroby Alzheimera wykazały wzrost ekspresji tego białka w komórkach mikrogleju i astrogleju w pobliżu plak amyloidowych (Parvathenani i wsp. 2003). Carmo i współpracownicy (2014) wykazali udział P2X7R w powstawaniu deficytów neurologicznych oraz uszkodzeń w szczurzym modelu choroby Parkinsona. BBG, specyficzny antagonist receptoru P2X7, powodował zmniejszenie objawów charakterystycznych dla tego modelu, oraz zmniejszał deficyt dopaminy w miejscach dotkniętych zmianami patologicznymi (Carmo i wsp. 2014). Badania przeprowadzone przez grupę Yiangou wykazały podwyższoną ekspresję P2X7R w komórkach mikrogleju/makrofagach w rdzeniach kręgowych pobranych post mortem od pacjentów ze stwardnieniem zanikowym-bocznym (ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS) (Yiangou i wsp. 2006). Wykazano również wzrost ekspresji P2X7R w neuronach, astrocytach i mikrogleju w przebiegu niedokrwienia u szczurów (Franke i wsp. 2004) oraz na mikrogleju w trakcie ostrej i chronicznej padaczki u szczurów (Engel i wsp. 2012). W mysim modelu choroby

Huntingtona zaobserwowano wzrost ekspresji P2X7R w zakończeniach synaptycznych neuronów (Diaz-Hernandez i wsp. 2009). Myszy pozbawione funkcjonalnego genu P2X7R słabiej rozwijały zapalenie stawów indukowane za pomocą przeciwciał monoklonalnych przeciwko kolagenowi typu II (ang. monoclonal anticollagen-induced arthritis), a objawy choroby były mniej dotkliwe (Labasi i wsp. 2002). Ponadto, w mysim modelu dystrofii mięśniowej Duchenne'a obserwowano podwyższoną ekspresję mRNA dla P2X7R w mioblastach i miotubach, a blokowanie receptora za pomocą antagonisty zmniejszało liczbę nieprawidłowych komórek mięśniowych (Young i wsp. 2012). Wykazano również, że blokowanie receptora P2X7 powodowało zahamowanie wzrostu glejaka (Ryu i wsp. 2011). U ludzi chorujących na bóle neuropatyczne występował podwyższony poziom białka P2X7R w tkance nerwowej (Chessell i wsp. 2005), podobnie jak u zwierząt w modelu bólu neuropatycznego (Kobayashi i wsp. 2011). Poziom mRNA dla P2X7R wzrastał również u myszy, którym podano infekcyjne białko prionowe (PrP^{Sc}) (Takenouchi i wsp. 2007). Aktywacja P2X7R powodowała wystąpienie hiperalgezji u szczurów (Teixeira i wsp. 2014), natomiast podanie antagonisty P2X7R zmniejszało wtórne uszkodzenia w modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego (Wang i wsp. 2004; Peng i wsp. 2009). Ponadto, specyficzny antagonist P2X7R wykazywał właściwości przeciwzapalne oraz przeciwdepresyjne u myszy, którym podano LPS (Ma i wsp. 2014).

1.10.6. P2X7R w SM/EAE

Dotychczasowe badania nad udziałem receptora P2X7 w patomechanizmach SM/EAE są nieliczne. Badania na tkankach pobranych post-mortem wykazały wzrost ekspresji P2X7R w nerwach wzrokowych chorych na SM w stosunku do osób zdrowych (Matute i wsp. 2007), jak również wzrost ekspresji P2X7R w mikrogleju/makrofagach w rdzeniu kręgowym (Yiangou i wsp. 2006) i na reaktywnych astrocytach w mózgu (Narcisse i wsp. 2005).

W zwierzęcym modelu tej choroby wykazano jedynie nadekspresję P2X7R na oligodendrocytach oraz udział aktywacji tego receptora przez ATP w śmierci tych komórek. Stwierdzono również, że podanie antagonistów P2X7R redukuje powstawanie zmian demielinizacyjnych w modelu EAE (Matute i wsp. 2007). Badania na myszach bez funkcjonalnego genu P2X7R wykazały czterokrotnie mniejszą częstość zapadania zwierząt na EAE po ich immunizacji (Sharp i wsp. 2008).

Niemniej, istnieją również przeciwstawne badania, wskazujące raczej na neuroprotekcijną rolę P2X7R, w których myszy bez aktywnego genu P2X7R przechodziły EAE dużo ciężiej niż myszy kontrolne, przy braku różnic w początku oraz w szczycie objawów. Zarówno stan zapalny jak i stopień uszkodzenia tkanki nerwowej były u tych myszy dużo większe (Chen i Brosnan 2006).

Te fragmentaryczne badania, chociaż niespójne i częściowo sprzeczne, sugerują możliwy udział receptora P2X7R w patomechanizmach tej choroby.

2. Założenia i cel pracy

Dotychczasowe dane literaturowe dobrze dokumentują udział receptorów purynergicznych P2X7 zarówno w procesie zapalnym, jak i w procesach prowadzących do śmierci komórki, które stanowią dwie ważne składowe SM. Istnieją zatem przesłanki aby przypuszczać, że receptor ten może odgrywać znaczącą rolę w patologii tej choroby. Z uwagi na fakt, że dostępne obecnie terapie SM nie zawsze wykazują skuteczność i obciążone są wieloma efektami ubocznymi, istnieje potrzeba poszukiwania nowych, bardziej efektywnych leków. Dlatego badania nad receptorem P2X7, poszerzając wiedzę na temat patomechanizmów choroby, mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań o profilu farmakologicznym.

Celem niniejszej pracy było zbadanie potencjalnego udziału receptora purynergicznego P2X7 w przebiegu autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego u szczura, będącego eksperymentalnym modelem stwardnienia rozsianego.

Cel ogólny był realizowany w oparciu o następujące cele szczegółowe:

- Określenie czasowego profilu zmian ekspresji receptora P2X7 oraz jego komórkowej lokalizacji w przebiegu EAE
- Pośrednie scharakteryzowanie zmian aktywności receptora P2X7 w przebiegu choroby na podstawie poziomu cytokin prozapalnych oraz ekspresji paneksyny 1.
- Określenie wpływu antagonisty receptora P2X7 – BBG na rozwój i przebieg choroby
- Ocenę wpływu antagonisty P2X7R – BBG - na poziom białka cytokin prozapalnych, aktywację gleju oraz stan bariery krew-mózg.

3. Materiał i Metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenia zostały przeprowadzone na samicach szczurów szczepu Lewis o masie 180-210 g. Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni IMDiK PAN. Hodowane były w standardowych warunkach: stałej temperaturze (22°C) i wilgotności, przy stałym cyklu dobowym 12:12 godzin oraz przy nieograniczonym dostępie do wody i standardowej paszy.

Rdzenie kręgowe, wykorzystywane do immunizacji szczurów w modelu autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego, były izolowane ze świnek morskich pochodzących z hodowli Charles River Laboratories International Inc w Niemczech.

Wszystkie procedury wykonywane na zwierzętach zostały zatwierdzone przez IV Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie, numer uchwały: 09/2011; 47/2011; 48/2011.

3.2. Model stwardnienia rozsianego - autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego

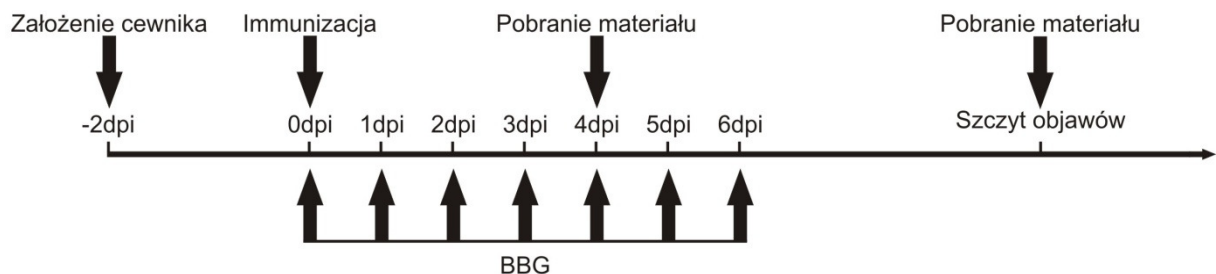
Autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego wywoływano poprzez jednorazową podskórną iniekcję szczepionki w obie tylne łapy szczura. Zabieg wykonywano w narkozie wziewnej (Narcotan – Halothanum, Zentiva, Praga, Republika Czeska) podawanej za pomocą kalibrowanego parownika w mieszaninie z tlenem. Szczepionka immunizacyjna zawierała homogenat rdzenia kręgowego świnki morskiej w roztworze soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (ang. phosphate buffered saline, PBS) (w stosunku 1:1), zawieszony w CFA (Difco, Detroit, USA) (w stosunku 1:1) oraz 2mg/ml martwych bakterii *Mycobacterium tuberculosis* (Difco H37RA, Detroit, USA) (Tsunoda i Fujinami 1996; Kwiatkowska-Patzer i wsp. 2009).

Masę ciała zwierząt oraz rozwój objawów neurologicznych monitorowano codziennie. Objawy neurologiczne opisywano w pięciostopniowej skali: 1-niedowład ogona; 2-porażenie ogona i niedowład tylnych łap; 3-porażenie tylnych łap; 4-postępujący porażenie; 5-śmierć (Kerschensteiner i wsp. 2004).

3.3. Zabieg chirurgiczny zakładania cewników dożylnych w celu podania antagonisty receptora P2X7

Szczury poddawano narkozie przy użyciu ketaminy (Bioketan, Vetoquinol Biowet) i medetomidyny (Domitor, Orion Pharma) w dawce odpowiednio: 70 mg/kg masy ciała i 0,5 mg/kg masy ciała podanych dootrzewnowo. Następnie zwierzętom usuwano sierść na bocznej i brzusznej stronie szyi oraz na karku. Skórę na szyi nacinano i izolowano żyłę szyjną wewnętrzną. Po założeniu podwiązki na części dogłowej, żyłę nacinano a do światła naczynia wprowadzano cewnik (Rat Jugular Catheter, Alzet). Cewnik wypełniony wcześniej solą fizjologiczną mocowano w naczyniu. Następnie przeprowadzano cewnik pod skórą na kark. Nacięcie na szyi zaszywano, a cewnik wypełniano roztworem zamykającym (30% glukoza, heparyna). Po zabiegu podawano podskórnie antybiotyki – gentamycynę w dawce 4 mg/kg.

Antagonistę receptora P2X7 - BBG podawano poprzez cewnik dożylny w dawce 50 mg/kg masy ciała zwierzęcia, codziennie, począwszy od dnia immunizacji (0 dpi) do szóstego dnia po szczepieniu (6 dpi) w bezobjawowej fazie EAE (Ryc. 6).

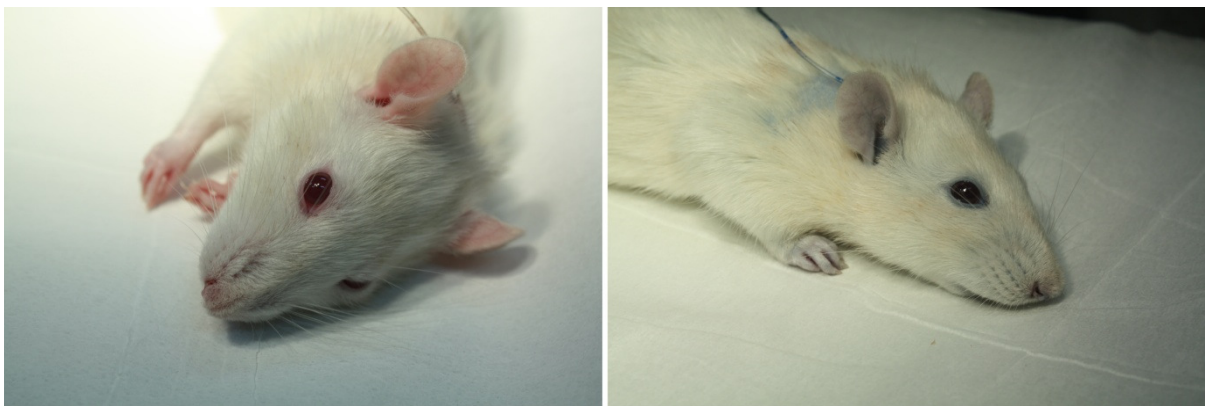


Rycina 6. Schemat doświadczenia, w którym zwierzętom z wywołanym EAE podawano antagonistę receptora P2X7 – BBG. Materiał do dalszych badań pobierano w fazie bezobjawowej (4 dpi) oraz w fazie objawowej choroby.

Dawkę antagonisty dobrano na podstawie doniesień literaturowych oraz własnych badań wstępnych. BBG jest uważany za związek nietoksyczny. Jest to pochodna barwnika używanego w przemyśle spożywczym – błękitu brylantowego FCF (E133) (Peng i wsp. 2009).

BBG jest również używany jako barwnik do podbarwiania błon w trakcie operacji siatkówki, gdzie również wykazano brak działania toksycznego na tę tkankę (Ooi i wsp. 2013).

Prawidłowe założenie cewnika oraz podanie BBG, ze względu na intensywnie niebieską barwę antagonisty, skutkowało stosunkowo szybką zmianą zabarwienia oczu zwierzęcia z czerwonej na ciemnoniebieską oraz skóry uszu i łap na kolor sinoniebieski (Ryc. 7). Zmiany barwy skóry wynikają z odkładania się w tkance niebieskiego barwnika co jest jedynym ze znanych z literatury skutków ubocznych. U zdrowych zwierząt z grupy kontrolnej, którym podano BBG nie obserwowano zmian w zachowaniu ani innych efektów ubocznych.



Rycina 7. Widoczny efekt dożylnego podania BBG szczurowi. Po lewej szczur przed podaniem BBG, po prawej po podaniu BBG. Oczy zwierzęcia po podaniu BBG zabarwiają się na kolor ciemnoniebieski a skóra nabiera koloru sinoniebieskiego.

3.4. Grupy eksperymentalne

W doświadczeniach użyto następujące grupy zwierząt:

- Zwierzęta kontrolne, zdrowe, które nie zostały poddane żadnym procedurom (kontrola) (n=28)
- Zwierzęta, u których wywołano EAE (EAE) (n=117)
- Zwierzęta którym założono cewnik dożylny, wywołano EAE a następnie podawano roztwór soli fizjologicznej (EAE+NaCl) (n=16)
- Zwierzęta którym założono cewnik dożylny, wywołano EAE a następnie podawano BBG - specyficznego antagonistę receptora P2X7 (EAE+BBG) (n=16)

3.5. Przygotowanie materiału do badań

3.5.1. Preparatyka homogenatów mózgowych

Zwierzęta dekapitowano. Wyizolowane mózgi homogenizowano w 4 ml buforu PBS zawierającego 10 mM EGTA (ang. ethylene glycol tetraacetic acid), 10 mM EDTA (kwas wersenowy, ang. ethylenediaminetetraacetic acid), 0,1 mM fluorku fenylometylosulfonylu (PMSF) i 100 mM NaCl, oraz mieszaninę inhibitorów proteaz. Homogenaty zamrażano, a następnie używano do przeprowadzania analizy Western blot.

3.5.2. Izolacja frakcji komórkowej pochodzenia astrocytarnego (GPV, gliosomy)

Frację gliosomów (ang. glial plasmalemmal vesicles, GPV) izolowano według procedury opisanej przez Danielsa i Vickroy'a (1998) w modyfikacji Strużyńskiej (2000). Mózgi homogenizowano w 30 ml buforu homogenizacyjnego (0,32 M sacharoza, 1 mM EDTA), następnie wirowano (1000 x g; 10 min; 4°C) i odrzucano osad. Nadsącz wirowano (5000 x g; 15 min; 4°C) a osad ponownie odrzucano. Otrzymany nadsącz wirowano (33500 x g; 20 min; 4°C) w celu uzyskania osadu, który zawieszano w 12 ml buforu SEDH (0,32 M Sacharoza, 1 mM EDTA, 0,25 mM Ditiotreitól (DTT), 0,02 M Hepes) i nanoszono na gradient perkolu (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) (20% : 10% : 6% : 0%) Próby z gradientem wirowano (33500 x g; 10 min; 4°C). Frację GPV zbierano w interfacie pomiędzy 0%-6% perkolem, dodawano bufor SEDH do 12 ml a następnie wirowano (1000 x g; 20 min; 4°C) w celu oczyszczenia. Otrzymany supernatant rozcieńczano buforem SEDH do 18 ml a następnie wirowano: 33500 x g; 20 min; 4°C aby osadzić frakcję GPV (Daniels i Vickroy 1998; Strużyńska 2000).

3.5.3. Izolacja frakcji zakończeń nerwowych (frakcja synaptosomalna)

Izolację frakcji zakończeń nerwowych przeprowadzano według procedury opisanej przez Booth'a i Clarka (Booth i Clark 1978). Świeżo wyizolowane mózgi homogenizowano w medium izolacyjnym (0,32 M sacharoza, 1 mM EDTA), a następnie wirowano (1300 x g przez 3 min; 4°C). Po odrzuceniu osadu supernatant wirowano: 17000 x g przez 10 min; 4°C. Otrzymany osad zawieszano w 1,5 ml medium izolacyjnego (0,32 M sacharoza, 1 mM EDTA), a następnie dodawano 7,5 ml 12% fikolu (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). Mieszaninę umieszczano w probówce wirówkowej, na roztwór nanoszono 4,5 ml 7% fikolu a

następnie 4,5 ml medium izolacyjnego. Próby w gradiencie fikolu wirowano 99000 x g przez 30 min; 4°C. Synaptosomy uzyskiwano w interfazie pomiędzy 7% a 12% fikolem. Po rozcieńczeniu w medium izolacyjnym synaptosomy przepłukiwano, wirując przez 10 min w 17000 x g; 4°C.

3.5.4. Izolacja frakcji mielinowej

W celu wyizolowania frakcji mielinowej przy zastosowaniu metody opisanej przez Nortona i Poduslo (Norton i Poduslo 1973), mózg homogenizowano w 18 ml 0,32 M roztworu sacharozy (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), a następnie otrzymany homogenat nakładano na 15 ml 0,85 M sacharozy i wirowano przy 75000 x g; 30 min; 4°C. Interfazę zebraną pomiędzy 0,32 M a 0,85 M sacharozą, zawieszano następnie w 32 ml H₂O i wirowano przy 75000 x g; 15 min; 4°C. Osad zawieszono ponownie w 32 ml H₂O i wirowano 12000 x g; 15 min; 4°C, powtarzając tę procedurę dwukrotnie. Otrzymany ostatecznie osad zawieszano w 18 ml 0,32 M sacharozie, nakładano na 15 ml 0,85 M sacharozy i wirowano gradient przy 75000 x g; 30 min; 4°C. Interfazę zebraną pomiędzy 0,32 M a 0,85 M sacharozą zawieszono w 32 ml H₂O a następnie wirowano 75000 x g; 15 min; 4°C. Osad zawieszono ponownie w 32 ml H₂O i wirowano 12000 x g; 15 min; 4°C. Otrzymaną mielinę zawieszano w wodzie z inhibitorami proteaz.

3.5.5. Izolacja frakcji mikronaczyń mózgowych

Izolację przeprowadzano według procedury opisanej przez Mrsulja i współpracowników (1976). Świeżo wypreparowane mózgi oczyszczano z opon mózgowych, dużych naczyń krwionośnych oraz istoty białej. Do dalszych procedur wykorzystywano istotę szarą, którą homogenizowano w 10 ml buforu Krebs–Ringer Hapes (40 mM NaCl; 4 mM KCl; 9 mM CaCl₂; 10 mM Hapes), następnie wirując trzykrotnie (1500 x g, 4°C, 10 min). Nadsącz odrzucano a osad zawieszano ponownie w buforze Krebs–Ringer Hapes. Po ostatnim wirowaniu osad zawieszono w 10 ml 0,25 M sacharozy a następnie nakładano na gradient sacharozy (0,25 M; 1 M; 1,5 M). Gradient wirowano 30000 x g przez 30 min w 4°C. Frakcję mikronaczyń zbierano z dna probówki i zawieszano w 0,5 ml buforu Krebs–Ringer Hapes. Wydajność izolacji oraz czystość frakcji naczyniowej oceniano pod mikroskopem świetlnym (Ryc. 8) (Mrsulja i wsp. 1976).



Rycina 8. Reprezentatywny obraz wyizolowanych mikronaczyń. Powiększenie x20.

Wszystkie opisane powyżej frakcje są rutynowo izolowane w Pracowni Patoneurochemii IMDiK. Wydajność izolacji oraz czystość frakcji były wcześniej oceniane w badaniach mikroskopowo-elektronowych bądź pod mikroskopem świetlnym (jak w przypadku frakcji mikronaczyń mózgowych), jak również pod kątem czynnościowym oraz występowania markerów charakterystycznych dla danej puli komórkowej.

3.6. Analiza histologiczna materiału otrzymanego ze zwierząt poddanych EAE

Analizę histologiczną skrawków mózgowych wykonano we współpracy z Zakładem Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej IMDiK PAN. Analizy dokonano przy użyciu klasycznych metod barwień histologicznych oraz immunohistochemicznych w celu oceny pod kątem występowania zmian charakterystycznych dla tego modelu choroby. W ustalonych czasach po immunizacji zwierzęta były poddawane subletalnej narkozie za pomocą mieszanki ketamina (0,67 ml/kg masy ciała) -ksylazyna (0,5 ml/kg masy ciała) (Vetoquinol Biowet). Następnie przeprowadzano przezsercową perfuzję przy użyciu 4% roztworu paraformaldehydu w PBS. Pobierano mózgi oraz rdzeń kręgowy, które dotrwalano płynem perfuzyjnym, zatapiano w parafinie i cięto na mikrotomie na skrawki o grubości 8 μm . Tak

przygotowane skrawki poddawano uwodnieniu poprzez przeprowadzenie ich przez roztwory o zmniejszającym się stężeniu etanolu (100%; 96%; 70%; po 2 min). Na koniec odpłukiwano przez 2 min w wodzie.

Wybarwione skrawki były oglądane przy pomocy mikroskopu świetlnego BX40F, Olympus. Fotografie wykonano za pomocą mikroskopu AH3 Olympus i aparatu 3-35AD-4, Olympus.

3.6.1. Barwienie hematoksylina-eozyna

Uwodnione skrawki były umieszczane w wodnym roztworze hematoksyliny przez 3 min, a następnie płukane w wodzie destylowanej przez 15 min. Skrawki barwiono w roztworze 1% eozyny przez 1 min. Następnie płukano preparaty w wodzie destylowanej, odwadniano poprzez inkubację w wzrastających stężeniach etanolu (96%; 100%) oraz w ksylenie, po czym zatapiano w balsamie i zakrywano szkiełkiem nakrywkowym.

3.6.2. Barwienie fioletem krezyłu

Uwodnione skrawki były inkubowane przez 3 min w 1% wodnym roztworze fioletem krezyłu. Nadmiar barwnika odpłukiwano przez 3 min w wodzie, przeprowadzono przez wzrastające stężenia alkoholu etylowego (70%, 96%) i następnie inkubowano przez 4 min z 96% roztworem etanolu w 10% kwasie octowym. Po odbarwieniu skrawków przeprowadzono je przez roztwory etanolu 96% i 100% przez 2 min; 50% etanol w ksylenie oraz 100% ksylen po 4 min. Po odwodnieniu skrawki zalewano balsamem, nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i pozostawiano do wyschnięcia.

3.6.3. Barwienia GFAP oraz albuminy

Uwodnione skrawki tkanki umieszczone na szkiełkach podstawowych, permabilizowano za pomocą buforu PBS zawierającego 0,5% Triton X100. Blokowano endogenną peroksydazę za pomocą 3% roztworu H₂O₂. Niespecyficzne wiązanie się przeciwciał blokowano za pomocą 10% roztworu albuminy w PBS, po czym skrawki były inkubowane z przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciwko białku GFAP (1:2000, DAKO) lub albuminy (1:150, MP Biomedicals). Nadmiar przeciwciał odpłukiwano (3x15 min). Następnie skrawki inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi (1:1500, Anti-Rabbit IgG (H+L)-biotin, DAKO) po czym płukano dwukrotnie w PBS. W dalszej kolejności skrawki inkubowano ze streptawidną sprzężoną z peroksydazą (1:500, Streptavidin-

Peroxidase, DAKO) i powtórnie płukano (2xPBS). Kolejnym krokiem była detekcja przeciwciał drugorzędowych za pomocą chromogenu DAB (3,3' Diaminobenzidine, DAKO). W wyniku reakcji otrzymano złogi barwnika w miejscu występowania przeciwciał. Skrawki były odwadniane oraz zamykane balsamem i szkiełkiem nakrywkowym.

3.7. Analiza mRNA receptora P2X7 metodą RT-PCR

3.7.1. Izolacja całkowitego RNA z mózgu szczura

Całkowite RNA z tkanki zostało wyizolowane za pomocą metody opisanej przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987) przy użyciu Sigma TRI-Reagent. Tkanka została zhomogenizowana w szklanym homogenizatorze w odczynniku TRI-Reagent (1 ml na 100 mg tkanki). Próbkę inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej, po czym dodano chloroform (0,2 ml na 1 ml Tri-Reagent), wstrząsano przez 15 s, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Próbkę wirowano (12000 x g, 15 min, 4 °C), a następnie zebrano bezbarwną wodną fazę zawierającą RNA. Po przeniesieniu do nowej próbki, dodawano 2-propanol (0,5 ml na 1 ml Tri-Reagent), inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano (12000 x g, 10 min, 4 °C), usuwano supernatant. Uzyskany osad płukano 75% etanolem (1 ml na 1 ml Tri-Reagent), a następnie wirowano (7500 x g, 5 min, 4 °C). Osad, po odrzuceniu supernatantu, suszono, a następnie zawieszano w wodzie (Chomczynski i Sacchi 1987).

3.7.2. Reakcja RT-PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) została przeprowadzona za pomocą Enhanced Avian HS RT-PCR kit (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). Reakcję RT-PCR przeprowadzono w następujących warunkach: 94°C przez 5 min, następnie 35 cykli (94°C przez 45 s; 58°C przez 60 s i 72°C przez 60 s) następnie utrzymywano 72°C przez 10 min. Próbkę po przeprowadzeniu reakcji były przechowywane w 4°C. Do reakcji PCR użyto następujących starterów dla genu P2X7R: 5'-GTGCCATTCTGACCAGGGTTGTATAAA-3' i antysensowny – 5'-GCCACCTCTGTAAAGTTCTCTCCGATT-3' (Oligo.pl). Otrzymano produkt o wielkości 354 par zasad. Jako wewnętrzną pozytywną kontrolę wykorzystano produkt starterów dla dehydrogenazy aldehydu 3 fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), które dały produkt wielkości 118 par zasad. Do tej reakcji użyto

następujących starterów: 5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' i antysensownego 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'. Produkty tej reakcji następnie rozdzielano za pomocą elektroforezy w 2% żelu agarozowym. Prążki były wizualizowane za pomocą barwienia bromkiem etydyny. Densytometria prążków została wykonana za pomocą aparatu NucleoVision przy użyciu oprogramowania GelExpert 4.0 firmy NucleoTech.

3.8. Elektroforeza białka i immunodetekcja metodą Western blot

3.8.1. Oznaczenie stężenia białka metodą Lowry'ego

Stężenie białka w homogenatach i frakcjach mózgowych zostało oznaczone za pomocą metody Lowry'ego (Lowry i wsp. 1951). Do oznaczenia użyto 10 µl próbki rozcieńczonej w 0,99 ml wody oraz próby wzorcowej zawierającej 100 µg/ml albuminy surowicy bydlęcej (BSA). Następnie dodawano 4 ml mieszaniny odczynnika A i B (1:50). Odczynnik A zawiera 2% Na₂CO₃ w 0,1 N NaOH, a odczynnik B 0,5% CuSO₄ *5H₂O w 1% cytrynianie sodu. Mieszaninę A+B + próba inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej a następnie dodawano 0,5 ml odczynnika Folina. Po 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej oznaczano absorbancję przy długości fali 655 µm przy użyciu spektrofotometru (Amersham Bioscience, Ultrospec 2100pro). Stężenie białka obliczano w odniesieniu do próby odczynnikowej (nie zawierającej białka) oraz względem próby wzorcowej o znanym stężeniu białka.

3.8.2. Rozdział elektroforetyczny białek

Próbki badanego materiału (homogenat mózgowy, frakcje komórkowe) poddawano elektroforezie jednokierunkowej SDS-PAGE (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodecylosiarczanem sodu, ang. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Przed elektroforezą do próbek dodawano w stosunku 1:1 bufor Laemmliego (zawierający 62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 1,5% β-merkaptoetanol; 0,05% błękit bromofenolowy), a następnie denaturowano przez 5 min w 100°C. Elektroforezę przeprowadzano w żelu poliakrylamidowym (4% żel zagęszczający i 7%; 10% lub 15% żel rozdzielający, w zależności od wielkości analizowanego białka) w buforze do elektroforezy (25 mM Tris; 192 mM glicyna; 0,5% SDS) przy użyciu aparatu do elektroforezy firmy BioRad. Na żel nakładano 50 µg białka, rozdzielano przez 15 min przy napięciu prądu wynoszącym 90 V a następnie przy napięciu 120 V aż do całkowitego rozwinięcia się elektroforezy.

Względne masy oznaczanych białek wyznaczano w oparciu o standardy białkowe „Sharp Pre-Stained Protein Standard” (Novex, ThermoFisher Scientific).

3.8.3. Elektrotransfer białek

Po zakończeniu elektroforezy przeprowadzano transfer białek na membranę nitrocelulozową 0,45 μm Hybond-Extra C (Amersham) w zestawie do transferu firmy BioRad. Żel umieszczano w kasecie razem z membraną oraz dociskającymi je bibułami Whatman 3 mm oraz porowatym materiałem. Całość zanurzano w buforze do transferu (25 mM Tris-HCl; pH 8,3; 192 mM glicyna; 20% metanol). Transfer prowadzono przez noc przy stałym natężeniu prądu wynoszącym 50 mA. Wydajność transferu sprawdzano barwiąc membrany w roztworze czerwieni Panceau (0,1% Panceau w 5% kwasie octowym w/v) i płucząc je następnie w roztworze PBS trzy razy po 10 min.

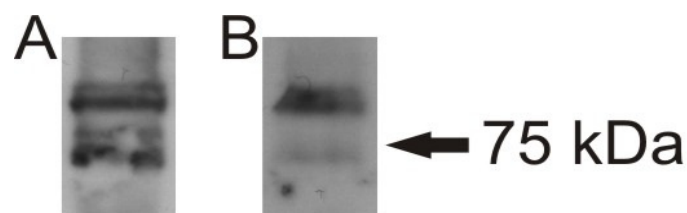
3.8.4. Immunodetekcja białek

Immunodetekcję białek na membranie nitrocelulozowej przeprowadzano przy użyciu przeciwciał pierwszorzędowych specyficznych dla analizowanych białek (**Tabela 1**). Błony nitrocelulozowe były inkubowane przez 1 godzinę z 5% mlekiem odtłuszczonym w celu zablokowania miejsc na błonie nitrocelulozowej, mogących niespecyficznie związać przeciwciała. Następnie membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi o stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta (**Tabela 1**) zawieszonymi w buforze PBST (80 mM NaH_2PO_4 pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,05% Tween 20) z 5% odtłuszczonym mlekiem przez noc w temperaturze 4°C. Nadmiar przeciwciał usuwano poprzez płukanie w buforze PBST (3x15 min, temperatura pokojowa). Następnie błony nitrocelulozowe inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową (**Tabela 2**), skierowanymi przeciwko przeciwciałom pierwszorzędowym, zawieszonymi w PBST z 5% odtłuszczonym mlekiem. Nadmiar przeciwciał drugorzędowych był usuwany poprzez płukanie w buforze PBST (3x15 min, temperatura pokojowa). Specyficzność reakcji kontrolowano poprzez przeprowadzenie immunodetekcji z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego. Lokalizacja przeciwciał drugorzędowych była uwidaczniana za pomocą komercyjnego zestawu ECL™ Western blotting detection reagent and analysis system (Amersham) i kliszy Hyperfilm™ ECL (Amersham). Klisze były skanowane za pomocą Image Scanner III (GE Healthcare)

a następnie densytometrowane za pomocą programu Image J 1,44p (Wayne Rasband, NIH, USA).

Jako wzorca wewnętrznego użyto przeciwciała specyficznego dla aktyny. Różnice w immunoreaktywności aktyny były następnie uwzględniane w wynikach dla badanych białek.

W przypadku immunodetekcji białka P2X7R przeprowadzono dodatkowo kontrolę z użyciem peptydu kontrolnego. Jest to fragment C końcowy białka P2X7R o sekwencji (C) KIRK EFPKT QGQYS GFKYP Y, który posłużył do wytworzenia specyficznego przeciwciała anty-P2X7R. Kontrolę przeprowadzono inkubując przeciwciała z oligopeptydem przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej przed nałożeniem na membranę nitrocelulozową. Następnie przeprowadzono procedurę immunodetekcji jak opisano powyżej. Doświadczenie to wykazało obniżenie immunoreaktywności prążka na wysokości 75 kDa w przypadku inkubacji przeciwciała z oligopeptydem w porównaniu do reakcji immunodetekcji przy użyciu przeciwciała, które nie było blokowane oligopeptydem (Ryc. 9). Wskazuje to na specyficzną wiązanie się przeciwciał do badanego białka.



Rycina 9. Reprezentatywne immunobloty przedstawiające kontrolę specyficznego przeciwciała skierowanego przeciwko białku P2X7R wykonaną z wykorzystaniem immunoblotu z homogenatu kontrolnego mózgu szczura. A - przedstawia immunoblot w którym wykorzystano przeciwciała anty P2X7R. B – przedstawia immunoblot w którym wykorzystano przeciwciała anty-P2X7R inkubowane wcześniej z peptydem kontrolnym. Obniżenie intensywności prążków po inkubacji z peptydem kontrolnym potwierdza specyficzną wiązanie przeciwciał do badanych antygenów.

Specyficzność przeciwciała	Gospodarz	Rozcieńczenie	Producent
P2X7R	Królik	1:200	Alomone Labs
GFAP	Mysz	1:1000	Sigma Aldrich
IL-1 β	Mysz	1:500	R&D Systems
TNF- α	Mysz	1:500	R&D Systems
IL-6	Mysz	1:250	R&D Systems
Klaudyna 5	Mysz	1:1000	Invitrogen
Aktyna	Mysz	1:400	MP Biomedicals
S-100 β	Mysz	1:1000	Sigma Aldrich
Koneksyna 43	Mysz	1:1000	Sigma Aldrich

Tabela 1. Przeciwciała pierwszorzędowe wykorzystane w badaniach Western blot.

Specyficzność przeciwciała	Gospodarz	Rozcieńczenie	Producent
Anty-mysz	Koza	1:10000	Sigma Aldrich
Anty-królik	Koza	1:10000	Sigma Aldrich
Anty-koza	Królik	1:10000	Sigma Aldrich

Tabela 2. Przeciwciała drugorzędowe wykorzystane w badaniach Western blot.

3.9. Barwienia immunohistochemiczne mózgow zwierząt kontrolnych oraz poddanych EAE

3.9.1. Przygotowanie skrawków mózgow do barwień immunohistochemicznych

Zwierzęta były wprowadzane w głęboka narkozę za pomocą subletalnej dawki Vetbutalu. Po kontroli braku odruchów bólowych, otwierano jamę brzuszną oraz klatkę piersiową zwierzęcia. Przecinano żyłę główną dolną a następnie wkłuwano się w lewą komorę serca. Za pomocą pompy perystaltycznej perfundowano zwierzęta 50 ml buforu fosforanowego (PBS; 7,4 pH) z 200 mg/l KCl o temperaturze 4°C a następnie 200 ml 4% paraformaldehydu (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) rozpuszczonego w PBS z KCl.

Mózgi wyizolowane z perfundowanych zwierząt, inkubowano w 4% paraformaldehydzie przez 2 godziny w temperaturze 4°C w celu dodatkowego utrwalenia. Po utrwaleniu mózgi były poddawane krioprotekcji. W tym celu inkubowano je, w temperaturze 4°C w rosnących stężeniach sacharozy (10%; 20%; 30%) (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), przez 24 godziny w każdym ze stężeń. Tkanki były następnie mrożone (-20°C) i cięte na skrawki (40µm) w kriostacie. Skrawki zbierano w PBS jako skrawki pływające a następnie przechowywano w temperaturze -20°C w roztworze zapobiegającym zamarzaniu (30% sacharoza, 60% glikol etylenowy, 0,05 M bufor fosforanowy, pH 7,4).

3.9.2. Procedura barwienia

Barwienie wykonywano na skrawkach pływających. Skrawki najpierw odpłukiwano z roztworu zapobiegającego zamarzaniu za pomocą buforu PBS (7,4 pH) z 0,2% Triton X100 (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), następnie przeprowadzono blokowanie miejsc niespecyficznego wiązania się przeciwciał oraz permabilizację błon komórkowych poprzez inkubację w 3% roztworze surowicy koziej bądź oślej (AbD Serotec) w PBS z 0,2% Tritonem X100 przez 20 min. Skrawki inkubowano przez noc w 4°C w buforze PBST z surowicą oraz odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi (**Tabela 3**). Nadmiar przeciwciał pierwszorzędowych usuwano poprzez kolejne płukania (3x15 min w PBST) a następnie skrawki inkubowano z barwnikiem Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), za pomocą którego wybarwiano jądra komórkowe oraz z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z barwnikiem fluorescencyjnym (**Tabela 4**). Skrawki były odpłukiwane (3x15 min w PBST) a następnie umieszczane na szkiełkach podstawowych pokrytych silanem

(Sigma aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). Pozostawiano je do wyschnięcia w 4°C a następnie zamykano przy użyciu medium Dako (Dako fluorescent mounting medium) (Dako, North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) oraz szkiełka nakrywkowego. Preparaty przechowywane były w temperaturze 4°C. W celu kontroli specyficzności barwienia w procedurze pomijano etap dodania specyficznych pierwszorzędowych przeciwciał.

Specyficzność przeciwciała	Gospodarz	Rozcieńczenie	Producent
P2X7R	Królik	1:200	Alomone Labs
GFAP	Mysz	1:1000	Sigma Aldrich
NeuN	Mysz	1:1000	Millipore
Iba1	Koza	1:500	Abcam
Panneksyna 1	Królik	1:500	Invitrogen
Klaudyna 5	Mysz	1:1000	Invitrogen
PDGFR β	Mysz	1:500	Abcam

Tabela 3. Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w badaniach immunohistochemicznych.

Specyficzność Przeciwciała	Fluorochrom	Gospodarz	Rozcieńczenie	Producent
Mysz	Alexa Fluor 594	Koza	1:200	Invitrogen
Królik	Alexa Fluor 594	Koza	1:200	Invitrogen
Królik	Alexa Fluor 488	Koza	1:200	Invitrogen
Koza	Alexa Fluor 546	Osioł	1:200	Invitrogen
Królik	DyLight 488	Osioł	1:200	Abcam

Tabela 4. Przeciwciała drugorzędowe użyte w badaniach immunohistochemicznych.

3.10. Analiza mikroskopowa

Wykonane preparaty immunohistochemiczne analizowane były przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego lub mikroskopów konfokalnych Zeiss LSM 510 oraz Zeiss LSM 780. Mikroskopy konfokalne wyposażone były w oprogramowanie ZEN Black Edition 2012. W celu wzbudzenia barwnika Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) użyto lasera 405 nm, do wzbudzenia barwnika Alexa Fluor 488 oraz DyLight 488 lasera argonowego 488 nm, natomiast do wzbudzenia barwników Alexa Fluor 546 i Alexa Fluor 594 lasera helowo-neonowego 543 nm. Ryciny zostały wykonane za pomocą programu Corel Draw X3.

W oprogramowaniu ZEN Black Edition 2012 wykonano pomiar średniej intensywności fluorescencji.

3.11. Analiza statystyczna

Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna wraz z odchyleniem standardowym (SD). Liczebność grup zwierząt została podana w legendach rycin.

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta bądź testu t-Studenta. W poszczególnych eksperymentach przyjęto następujące poziomy istotności statystycznej: $P < 0,0001$ - ****; $0,0001 < P < 0,001$ - ***; $0,001 < P < 0,01$ - **; $0,01 < P < 0,05$ - *. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism 5.

4. Wyniki

4.1. Model autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (EAE)

Jak opisano we wstępie (rozdział 1.7.), aktywnie wywoływane EAE jest najczęściej używanym i najlepszym modelem zwierzęcym SM. W pierwszym etapie badań przeprowadzono charakterystykę użytego modelu EAE na podstawie wybranych parametrów. W trakcie rozwoju EAE zwierzęta oceniano m. in. pod względem występowania charakterystycznych objawów neurologicznych, masy ciała oraz zmian histopatologicznych w OUN.

4.1.1. Rozwój i przebieg EAE

Zwierzęta immunizowane rozwijały typowe dla tego modelu objawy. Pierwszym widocznym objawem neurologicznym było pojawienie się niedowładów ogona, co następowało średnio 10-11 dnia po immunizacji (dpi). Niedowład ogona oceniany był na 1 punkt w pięciostopniowej skali (Kerschensteiner i wsp. 2004). Następnie objawy pogłębiały się, poprzez stopniowy niedowład tylnych łap (2 punkty) i porażenie tylnych łap (3 punkty) (Ryc. 10), aż do maximum, określanego jako porażenie tylnej części ciała (4 punkty) (Ryc. 11), który występował średnio w 13 dpi. Następnie do 20 dnia po immunizacji objawy całkowicie ustępowały. Uśredniona punktacja objawów oceniana w szczycie choroby dla różnych grup zwierząt wyniosła 2,85 (Ryc. 12).

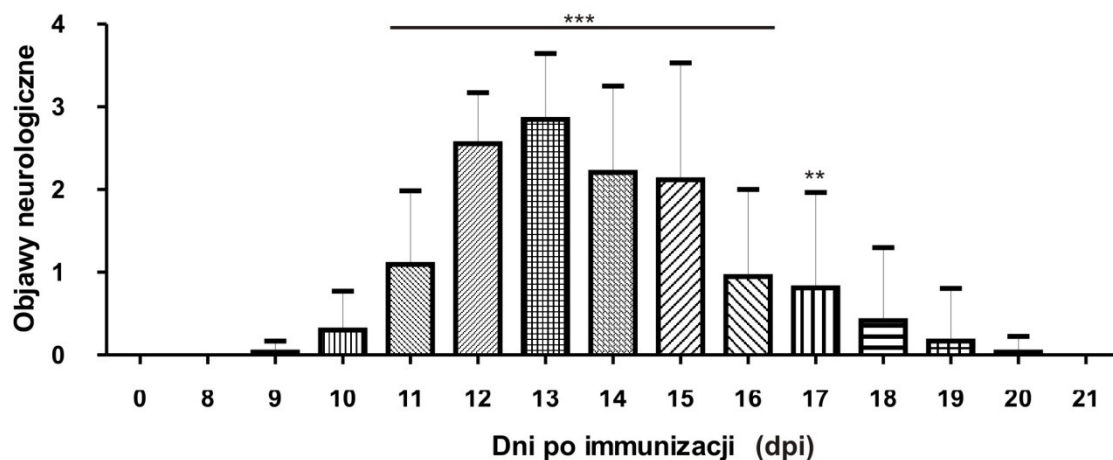
W przebiegu EAE obserwowano charakterystyczny spadek masy ciała zwierząt (Ryc. 13). Pierwszy istotny statystycznie spadek zanotowano w fazie bezobjawowej, między 1 dpi a 4 dpi, o 2,8% w stosunku do zwierząt kontrolnych nieimmunizowanych. Następny spadek masy immunizowanych zwierząt, o 3,8% w stosunku do masy ciała zwierząt z dnia 0, zanotowano w 10 dpi. Pomiędzy 12 a 24 dpi obserwowano fazę znacznego ubytku masy ciała, który był największy w 17 dpi i wynosił średnio 16% w stosunku do masy ciała z dnia 0. W czasie przebiegu eksperymentów nie zanotowano przypadków śmiertelnych u zwierząt, klasyfikowanych jako 5 punktów w użytej skali oceny objawów.



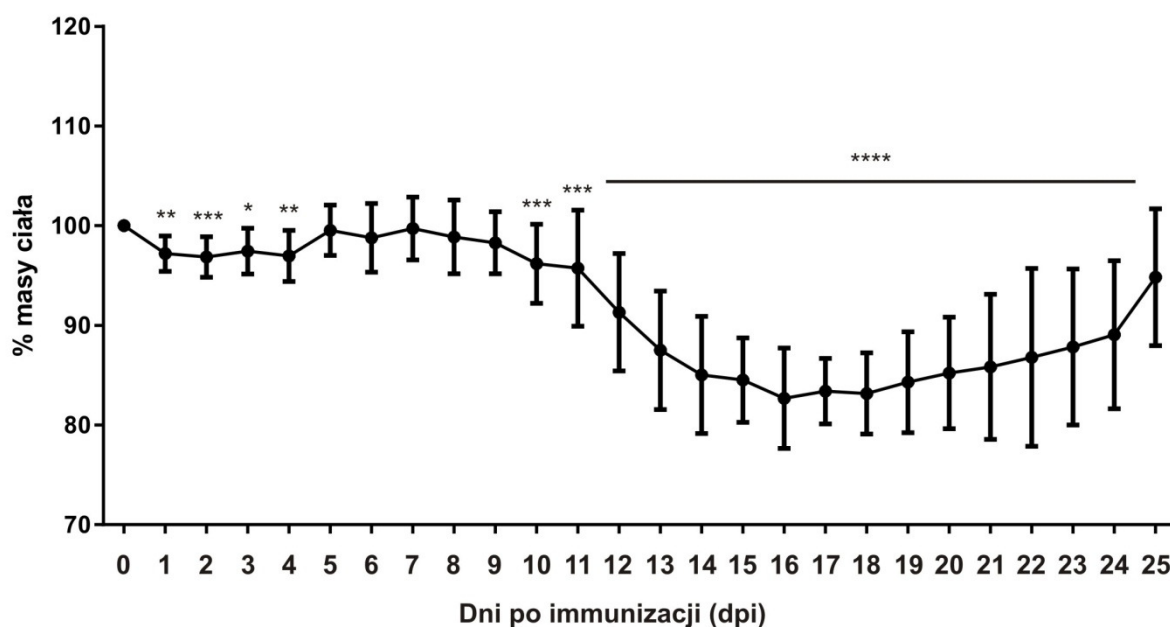
Rycina 10. Szczur u którego wywołano EAE. Widoczny niedowład ogona i tylnych łap (3 punkty w 5 stopniowej skali).



Rycina 11. Szczur u którego wywołano EAE. Widoczna porażenie tylnej części ciała wraz z ogonem oraz niedowład kończyn przednich (4 punkty w 5 stopniowej skali).



Rycina 12. Objawy neurologiczne obserwowane u zwierząt w rozwoju EAE. Deficyty neurologiczne były określane w 5 stopniowej skali. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SD dla liczby zwierząt $n=78$. (Jednoczynnikowa ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). $P < 0,001$ - *** vs. kontrola; $P < 0,01$ - ** vs. kontrola (0 dpi).



Rycina 13. Masa ciała zwierząt w przebiegu EAE wyrażona jako % masy zwierząt w dniu immunizacji (0 dpi). Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SD z liczby zwierząt $n=78$ dla każdego punktu czasowego. $P < 0,0001$ - **** vs. kontrola; $P < 0,001$ - *** vs. kontrola; $P < 0,01$ - ** vs. kontrola; $P < 0,05$ - * vs. kontrola (masa wyjściowa w dniu immunizacji 0 dpi). (Jednoczynnikowa ANOVA z testem Dunnetta).

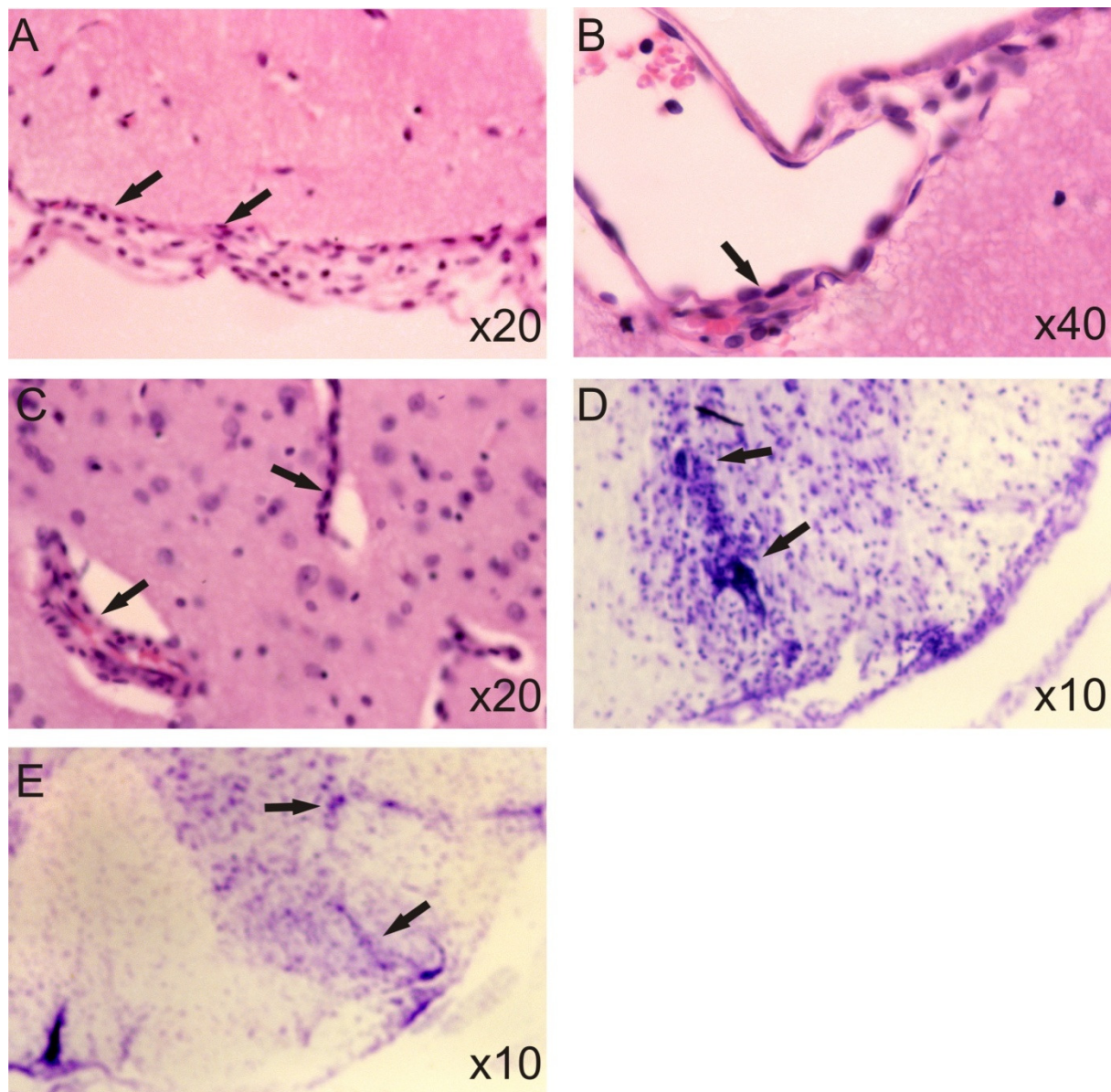
4.1.2. Charakterystyka zmian histopatologicznych w przebiegu EAE

W celu scharakteryzowania zastosowanego modelu EAE pod kątem zmian patologicznych zachodzących w OUN przeprowadzono serię badań histopatologicznych. Zbadano obecność nacieków zapalnych oraz zmian patologicznych w mielinie.

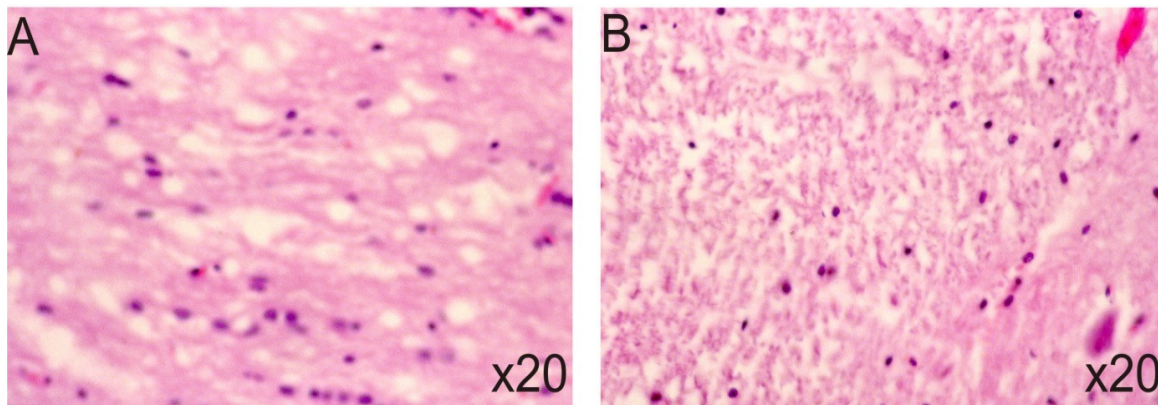
W obrazie mikroskopowym zarówno skrawków mózgu jak i rdzenia kręgowego szczurów poddanych EAE obserwowano liczne nacieki zapalne wokół naczyń mózgowych powstałe z komórek układu odpornościowego, które napłynęły w obręb tkanki (Ryc. 14).

Barwienie metodą hematoksylina-eozyna wykazało obecność nacieków okołonaczyniowych w różnych rejonach mózgu już w fazie bezobjawowej EAE tj. 2 dpi w oponie miękkiej mózgu (Ryc. 14 A, B) oraz w jądrach podstawy (Ryc. 14 C). Natomiast w rdzeniu kręgowym nacieki występowały głównie w fazie objawowej (10 dpi) na odcinku lędźwiowo-krzyżowym (Ryc. 14 D) oraz szyjnym (Ryc. 14 E)

Barwienia hematoksylina-eozyna wykazało zgębczenie istoty białej 6 dpi zarówno w mózdzku (Ryc. 15A) jak i w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego (Ryc. 15 B), co świadczy o występowaniu obrzęku istoty białej.



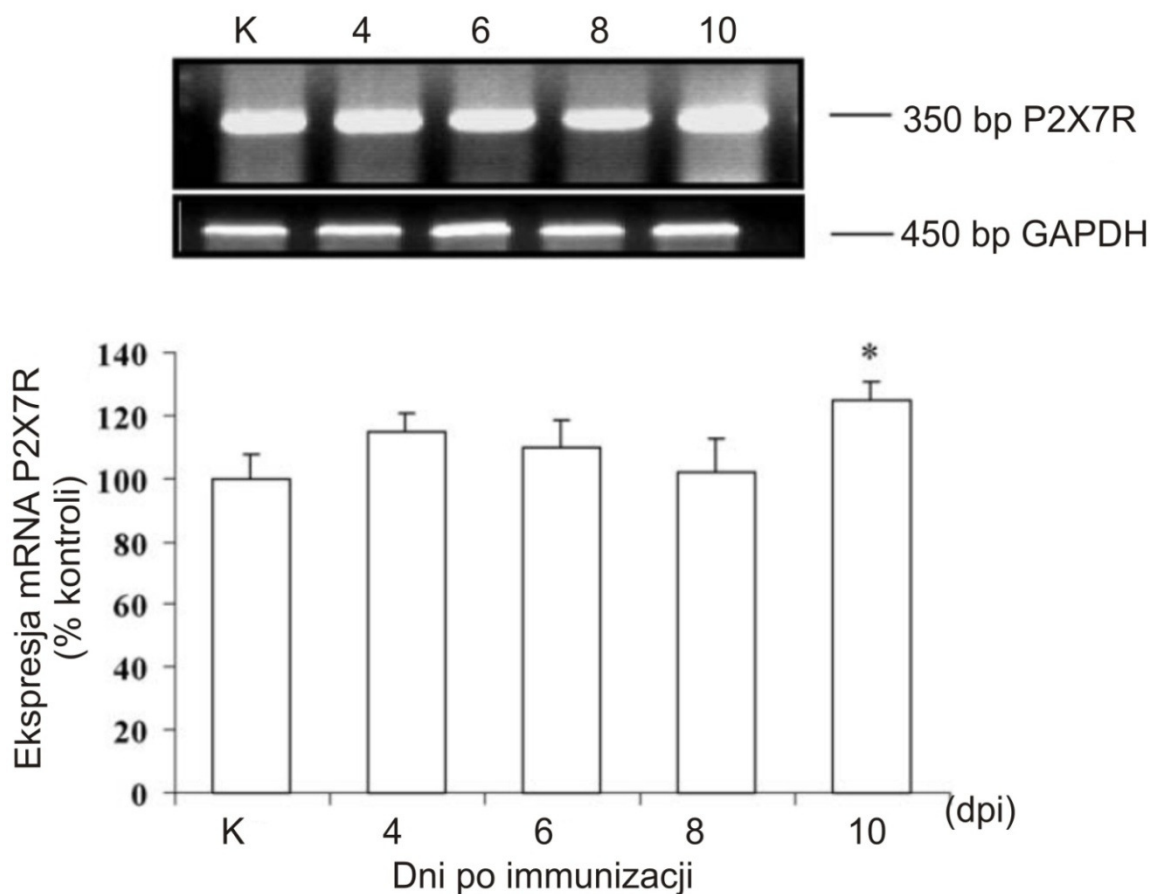
Rycina 14. Obecność nacieków okołonaczyniowych komórek układu odpornościowego w mózgu i rdzeniu kręgowym szczurów poddanych EAE. Naciek w oponie miękkiej mózgowej 2 dpi - A, 6 dpi - B. Naciek okołonaczyniowy w jądrach podstawy, 6 dpi – C, oraz rdzeniu kręgowym 10 dpi, odcinek lędźwiowo-krzyżowy – D, odcinek szyjny E. Strzałki wskazują nacieki zapalne. A, B, C - Barwienie hematoxylina-eozyna. D, E – Barwienie fioletem kryzylu.



Rycina 15. Zgąbczenie istoty białej w mózdzku (A) oraz w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego szczura poddanego EAE (6 dpi). Barwienie Hematoksylina-Eoazyne.

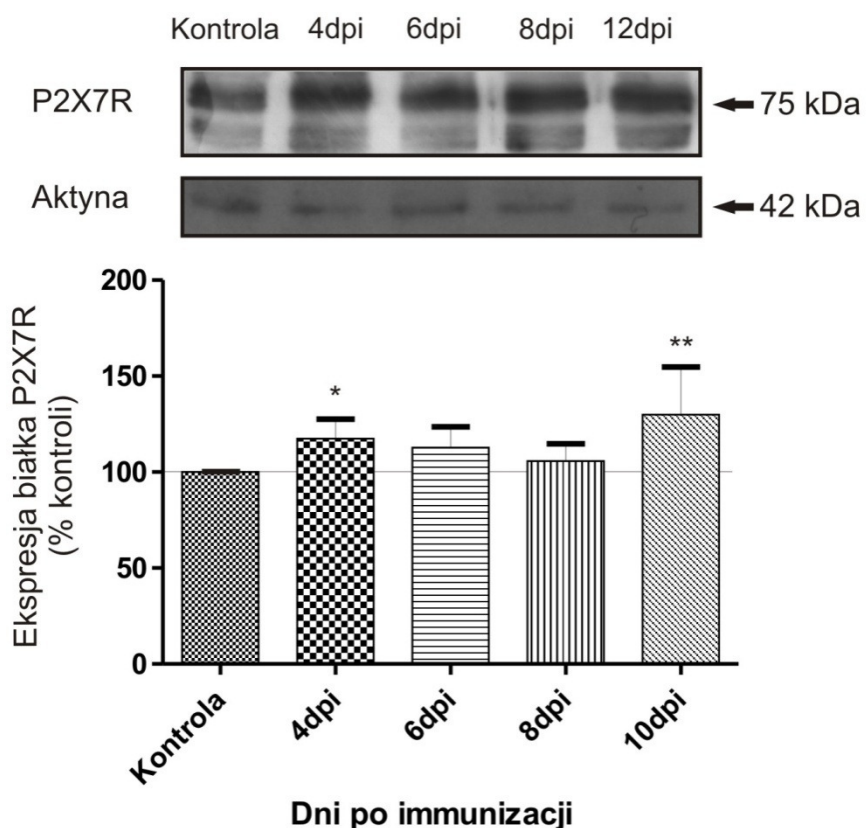
4.2. Czasowy profil ekspresji P2X7R w mózgu szczurów kontrolnych oraz poddanych EAE

Następnym etapem badań było określenie zmian ekspresji mRNA receptora P2X7 w homogenacie mózgu szczurów w przebiegu EAE. Wykazano statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA dla P2X7R o ok. 20% w stosunku do kontroli w fazie objawowej (10 dpi). W fazie bezobjawowej EAE (4 i 6 dpi) obserwowano jedynie tendencję wzrostową (Ryc. 16).



Rycina 16. Poziom ekspresji P2X7R mRNA w homogenatach mózgu zwierząt kontrolnych nieimmunizowanych (K) i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji. Reprezentatywny obraz elektroforezy cDNA po reakcji RT-PCR. Wykres przedstawiający wyniki z analizy densytometrycznej żeli znormalizowane w stosunku do GAPDH i przedstawione jako % kontroli; słupki przedstawiają wartości średnie \pm SD dla $n=4$ zwierząt w każdej grupie; * $P<0,05$ vs. Kontrola (jednoczynnikowa analiza wariancji - ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta).

Badanie ekspresji P2X7R na poziomie białka w homogenatach mózgow szczurów poddanych EAE przeprowadzono metodą Western blot. Badanie wykazało znamiennej statystycznie wzrost względnego poziomu białka zarówno we wczesnym etapie rozwoju choroby jak i w fazie objawowej. Poziom białka wzrastał odpowiednio o ok. 20% w 4 dpi i o ok. 30% w fazie objawowej, w stosunku do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych (Ryc. 17).



Rycina 17. Względny poziom białka P2X7R w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P < 0,01 vs. kontrola; *P < 0,05 vs. kontrola. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.

Otrzymane wyniki nasunęły pytanie o komórkowe źródło zwiększonego poziomu białka receptora P2X7. Dlatego też przeprowadzono serię doświadczeń z wykorzystaniem frakcji komórkowych izolowanych z mózgu szczurów kontrolnych oraz poddanych EAE.

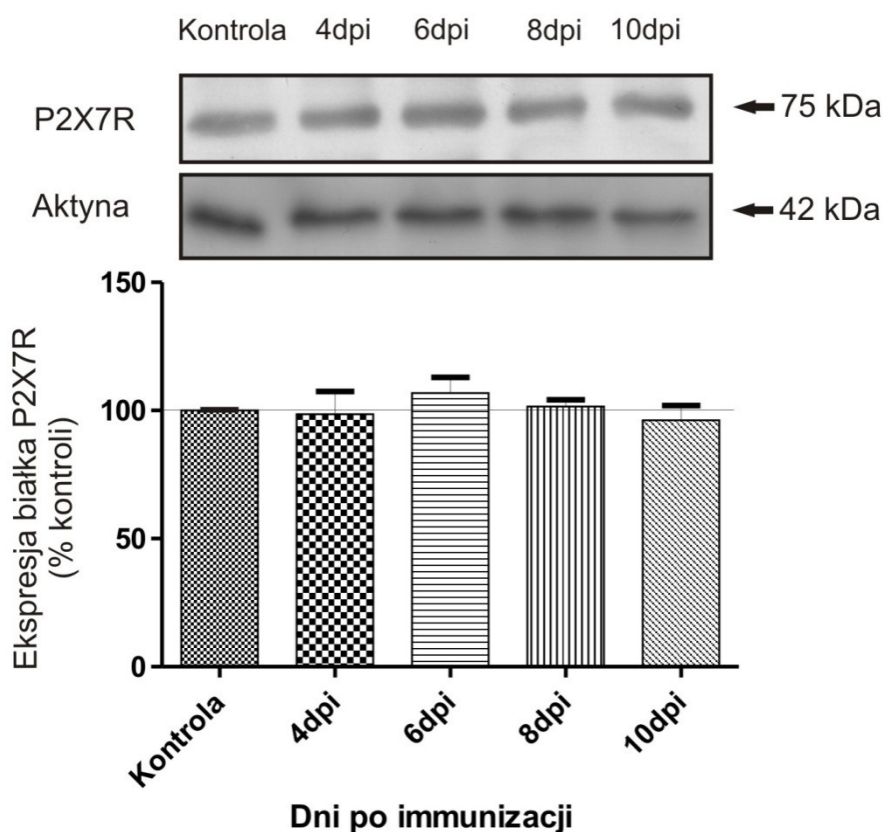
4.2.1. Identyfikacja komórkowej lokalizacji receptora P2X7

W dotychczasowych badaniach nad udziałem receptora P2X7 w patologii SM/EAE wykazano głównie wzrost jego ekspresji w oligodendrocytach (Matute i wsp. 2007). Inne pule komórkowe nie były badane. Dlatego postanowiono zbadać czy w przebiegu EAE

poziom białka receptora zmienia się w neuronach, mielinie, mikronaczyniach mózgowych oraz w komórkach glejowych (astroglej, mikroglej).

4.2.1.1. Ekspresja P2X7R w mielinie

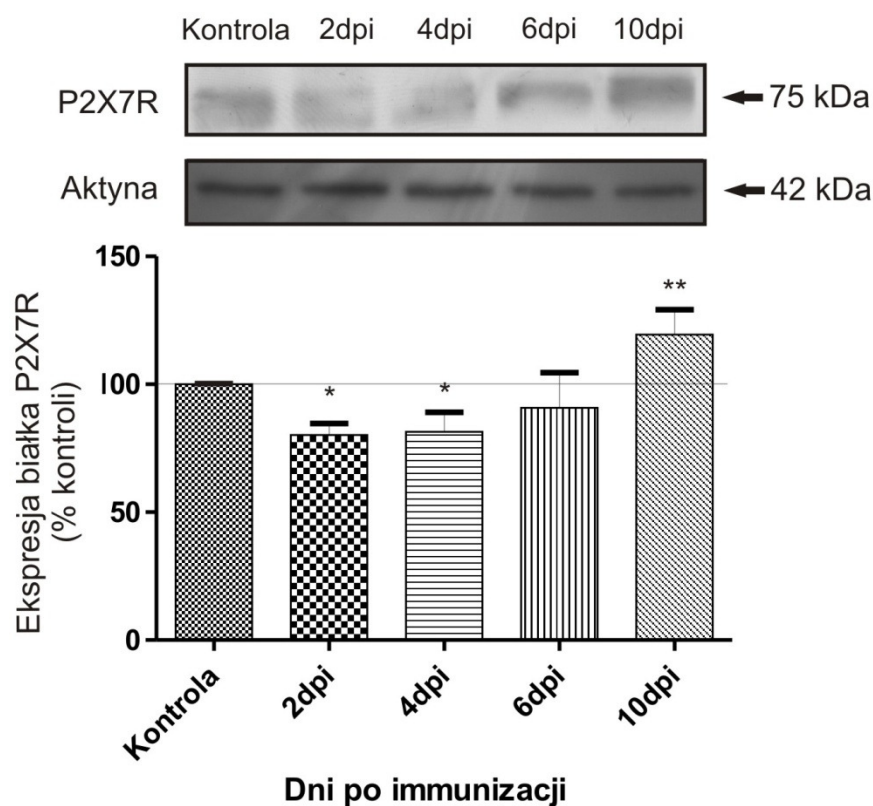
Badanie poziomu białka receptora P2X7R we frakcji mielinowej izolowanej ze zwierząt immunizowanych wykazało brak znaczących różnic w stosunku do zwierząt kontrolnych (Ryc. 18) w badanych fazach czasowych choroby.



Rycina 18. Względny poziom białka receptora P2X7 we frakcji mielinowej izolowanej z mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE w różnych czasach po immunizacji otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli. Brak różnic międzygrupowych istotnych statystycznie.

4.2.1.2. Neuronalna ekspresja P2X7R

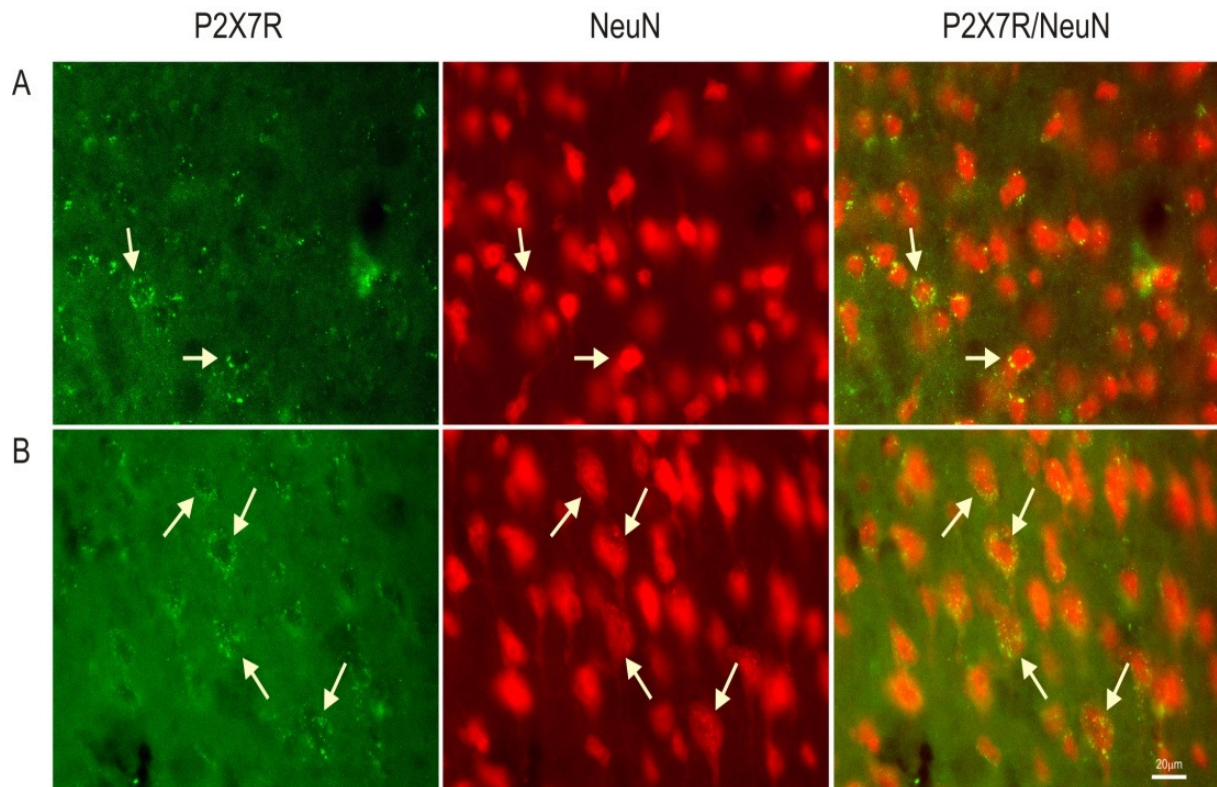
By zbadać neuronalną ekspresję białka P2X7R w trakcie rozwoju EAE przeprowadzono izolację frakcji synaptosomalnej z mózgu szczurów kontrolnych oraz w różnych czasach po immunizacji. Poziom białka P2X7R we frakcjach badano za pomocą metody Western blot. Zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu tego białka w fazie bezobjawowej (4 dpi) do około 80% wartości obserwowanych u zwierząt kontrolnych oraz wzrost jego poziomu o ok. 20% w stosunku do wartości kontrolnych w fazie objawowej EAE (10 dpi) (Ryc. 19).



Rycina 19. Względny poziom białka receptora P2X7 we frakcji synaptosomalnej izolowanej z mózgow zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P < 0,01 vs. kontrola; *P < 0,05 vs. kontrola. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.

Mikroskopowa analiza immunohistochemiczna skrawków mózgowych podwójnie barwionych przeciwciałami skierowanymi przeciwko białku jądrowemu specyficznemu dla

dojrzałych neuronów (ang. neuronal nuclei antygen, NeuN) oraz przeciwko białku P2X7R, potwierdziło lokalizację receptora P2X7 na komórkach nerwowych oraz profil zmian jego ekspresji w trakcie rozwoju EAE. Obserwowano wzrost immunofluorescencji białka P2X7R w obrębie komórek nerwowych w szczycie objawów neurologicznych w stosunku do kontroli (Ryc. 20).

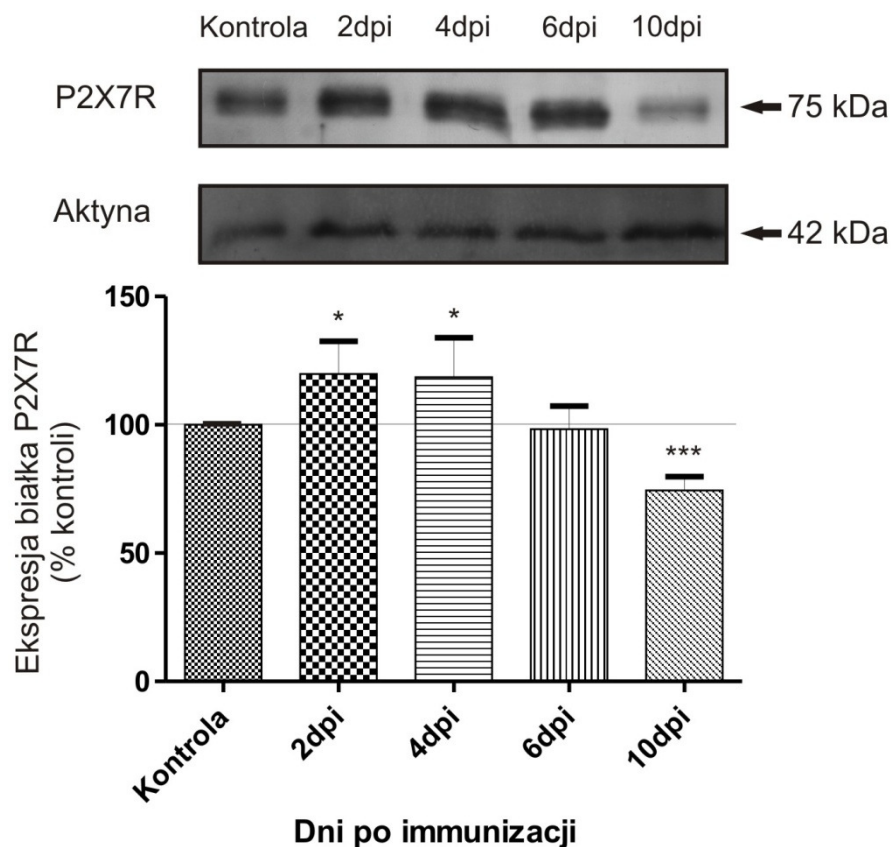


Rycina 20. Neuronalna ekspresja receptora P2X7 u zwierząt kontrolnych (A), oraz zwierząt poddanych EAE (10 dpi) (B). Skrawki mózgow były poddane podwójnemu barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał specyficznych dla P2X7R (zielony) oraz dla białka NeuN (czerwony). Strzałki wskazują przykładowe komórki wykazujące ekspresję obydwu białek. Skala – 20 μm .

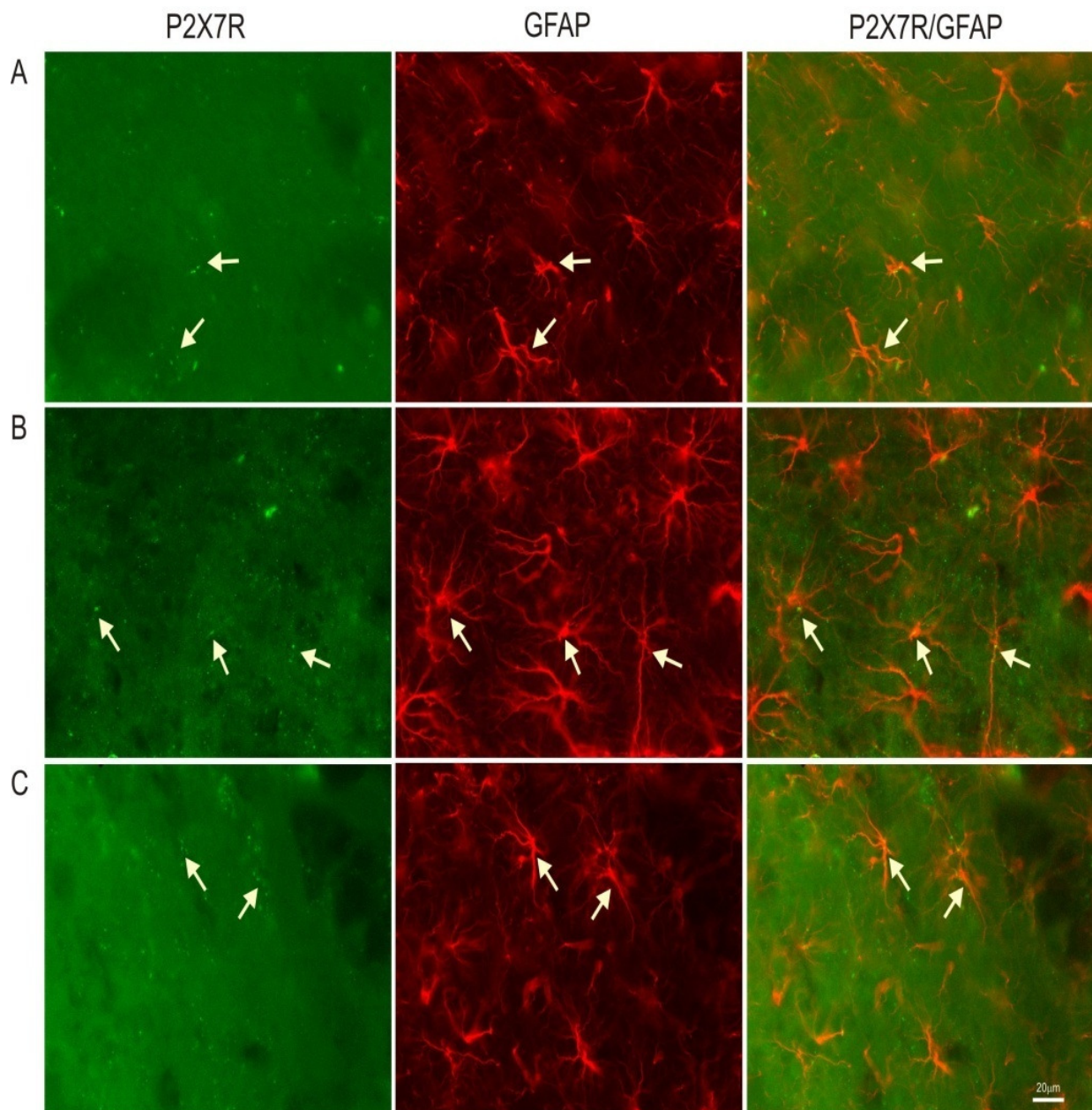
4.2.1.3. Astrocytarna ekspresja P2X7R

Czasowy profil ekspresji białka receptora P2X7 w puli astrocytarnej u zwierząt kontrolnych oraz po immunizacji został zbadany w izolowanej frakcji GPV techniką Western blot. Badanie to wykazało wzrost poziomu białka receptora w fazie bezobjawowej EAE (2 i 4 dpi) o około 20% w stosunku do poziomu kontroli. W fazie objawowej poziom białka obniżył się do 74% poziomu kontroli (Ryc. 21). Barwienie immunohistochemiczne skrawków mózgow zwierząt kontrolnych i poddanych EAE przy użyciu przeciwciała anty-GFAP (marker astrocytów) oraz anty-P2X7R wykazało kolokalizację obydwu białek oraz potwierdziło

częściowo profil zmian ekspresji białka P2X7R otrzymany metodą Western blot (Ryc. 22). W preparatach pochodzących ze zwierząt z EAE w fazie bezobjawowej obserwowano zwiększoną liczbę astrocytów wykazujących immunofluorescencję P2X7R.



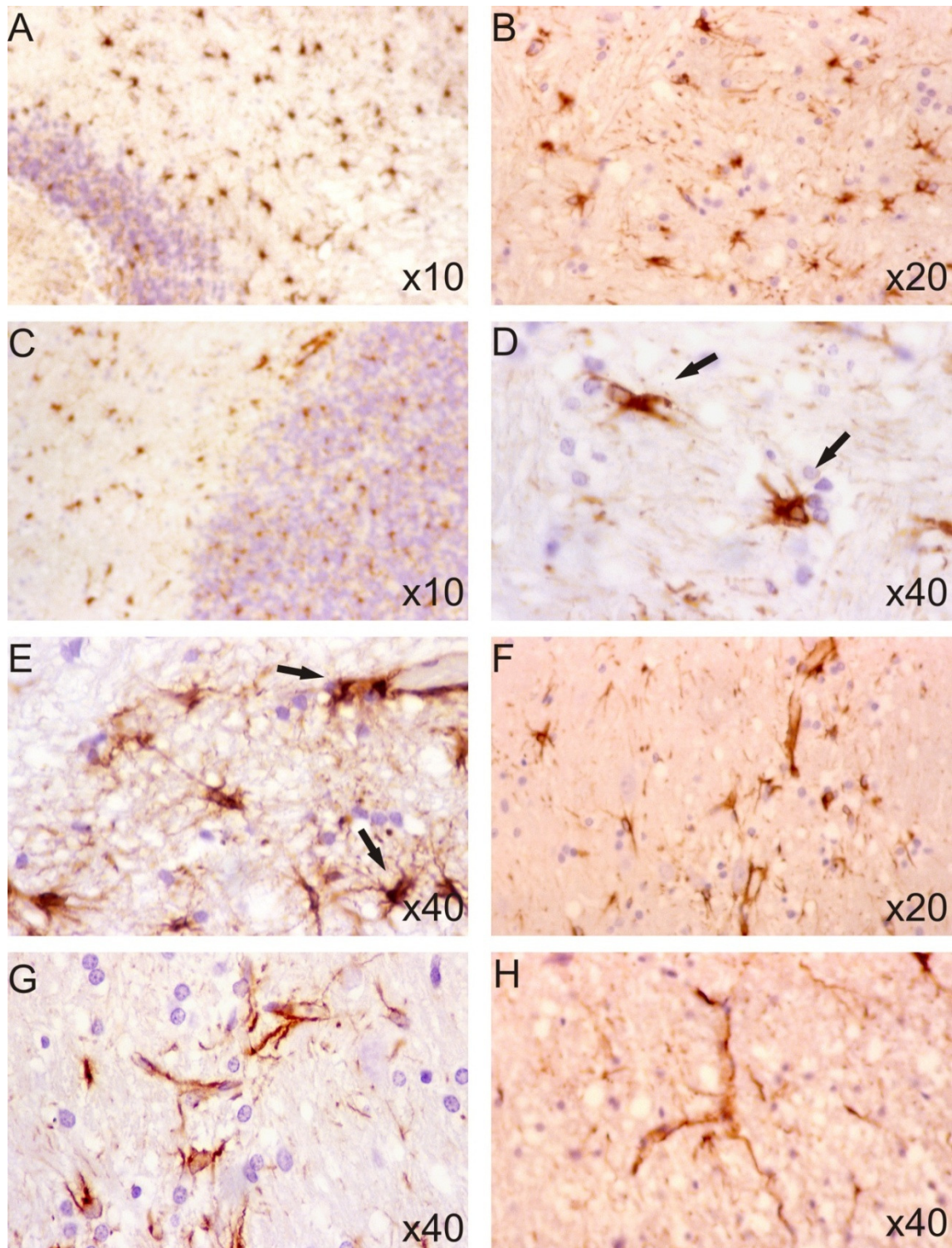
Rycina 21. Względny poziom białka P2X7R we frakcji GPV zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P < 0,01 vs. kontrola; *P < 0,05 vs. kontrola. (Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.



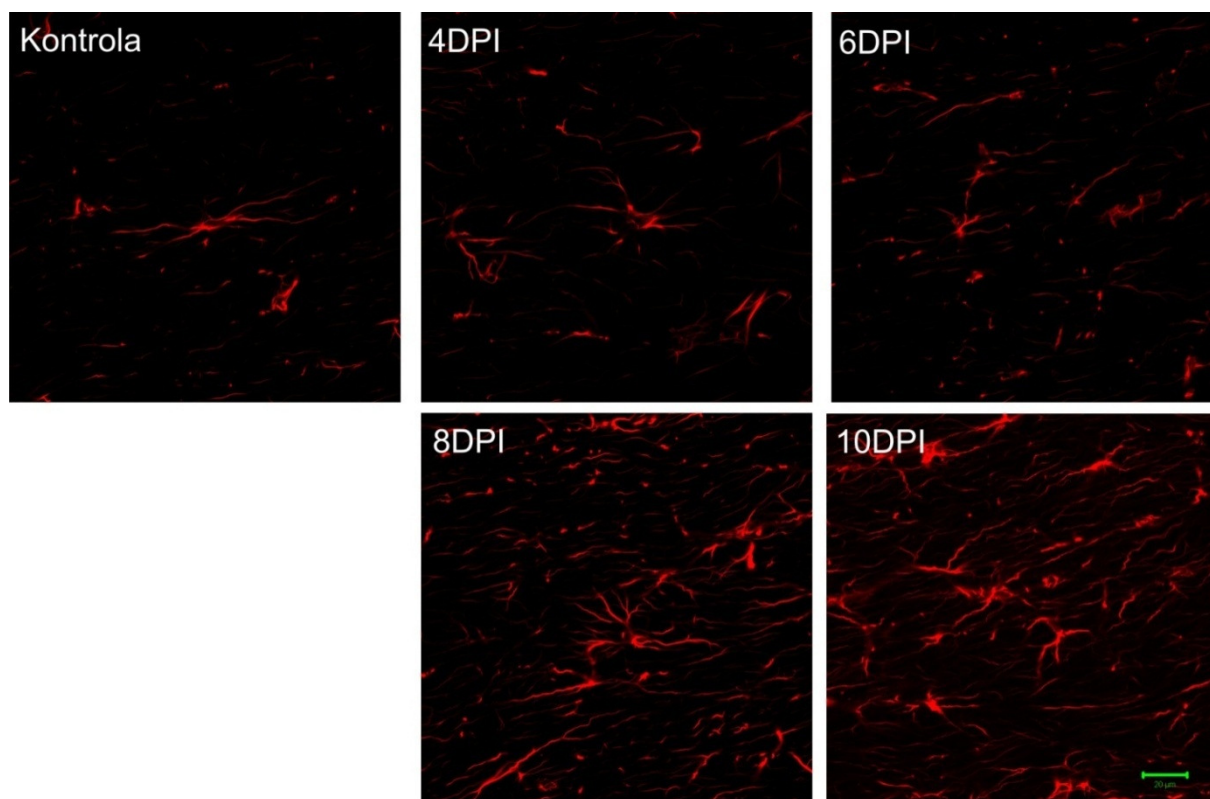
Rycina 22. Astrocytarna ekspresja receptora P2X7 u zwierząt kontrolnych (A), oraz zwierząt poddanych EAE – 4 dpi (B) i 10 dpi (C). Skrawki mózgu były poddane podwójnemu barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał specyficznych dla P2X7R (zielony) oraz dla białka GFAP (czerwony). Strzałki wskazują przykładowe komórki wykazujące ekspresję obydwu białek. Skala – 20 μ m.

Podwyższona ekspresja P2X7R we frakcji gliosomów w bezobjawowej fazie EAE może wskazywać na potencjalny udział astrocytów w początkowych etapach rozwoju patologii EAE. Jak opisano we wstępie, astrocyty ulegają pobudzeniu w różnego typu patologiami OUN, również w SM. Jednakże dotychczas reaktywną astrogliozę łączono z zaawansowanym stanem chorobowym i opisywano jako zjawisko wtórne do istniejącego stanu zapalnego i

lezji demielinizacyjnych. Ponieważ astrocyty mogą być źródłem neurotoksycznych substancji takich jak glutaminian czy ATP, postanowiono poddać je bardziej szczegółowym badaniom. Przeprowadzono wstępną ocenę stanu astrocytów za pomocą barwienia immunohistochemicznego przeciwciałami specyficznymi w stosunku do GFAP. Barwienie to wykazało pomnożenie astrogleju w istocie białej mózdzku w bezobjawowej fazie EAE – 4 dpi (Ryc. 23 A), 6 dpi (Ryc. 23 B i D) i 8 dpi (Ryc. 23 C). W fazie bezobjawowej – 6 dpi zaobserwowano również zmienione astrocyty o cechach klastomatodendrozy (Ryc. 23 D, E). Klastomatodendroza to patologiczny stan astrocytów będący efektem zachwiania równowagi energetycznej w komórce objawiający się wakuolizacją cytoplazmy. Obserwacje w mikroskopie świetlnym wykazały także obecność astrocytów okołonaczyniowych o zgrubiałych wypustkach w torebce zewnętrznej (Ryc. 23 F, G) oraz w rdzeniu kręgowym na odcinku lędźwiowo-krzyżowym oraz szyjnym u szczurów już w 6 dniu po immunizacji (Ryc. 23H). Przy użyciu mikroskopu konfokalnego w mózgach szczurów immunizowanych również obserwowano wzrost immunoreaktywności białka GFAP oraz zmiany morfologii astrocytów. Już w 4 dpi wypustki komórkowe były pogrubiłe i było ich zauważalnie więcej, co sugeruje aktywację komórek astrogleju. Największe zmiany obserwowano w rejonie spoidła wielkiego mózgu (Ryc. 24).



Rycina 23. Zmiany morfologiczne w astrocytach u szczurów poddanych EAE. Skrawki mózgow barwione równolegle z użyciem przeciwciał specyficznych wobec białka GFAP oraz przy użyciu metody hematoksylina-eozyna. Zdjęcia z mikroskopu świetlnego obrazują astrogliozę, (komórki wybarwione na brązowo) w istocie białej mózdzku w 4 dpi (A) oraz w 6 dpi (B), astrogliozę w istocie białej i warstwie ziarnistej mózdzku 8 dpi (C). Klazmatodendroza astrocytów w 6 dpi (D oraz E; strzałki) i zgrubienie wypustek astrocytów okołonaczyniowych w 6 dpi (F, G, H. F, G – Torebka zewnętrzna, H – Rdzeń kręgowy odcinek L-S).

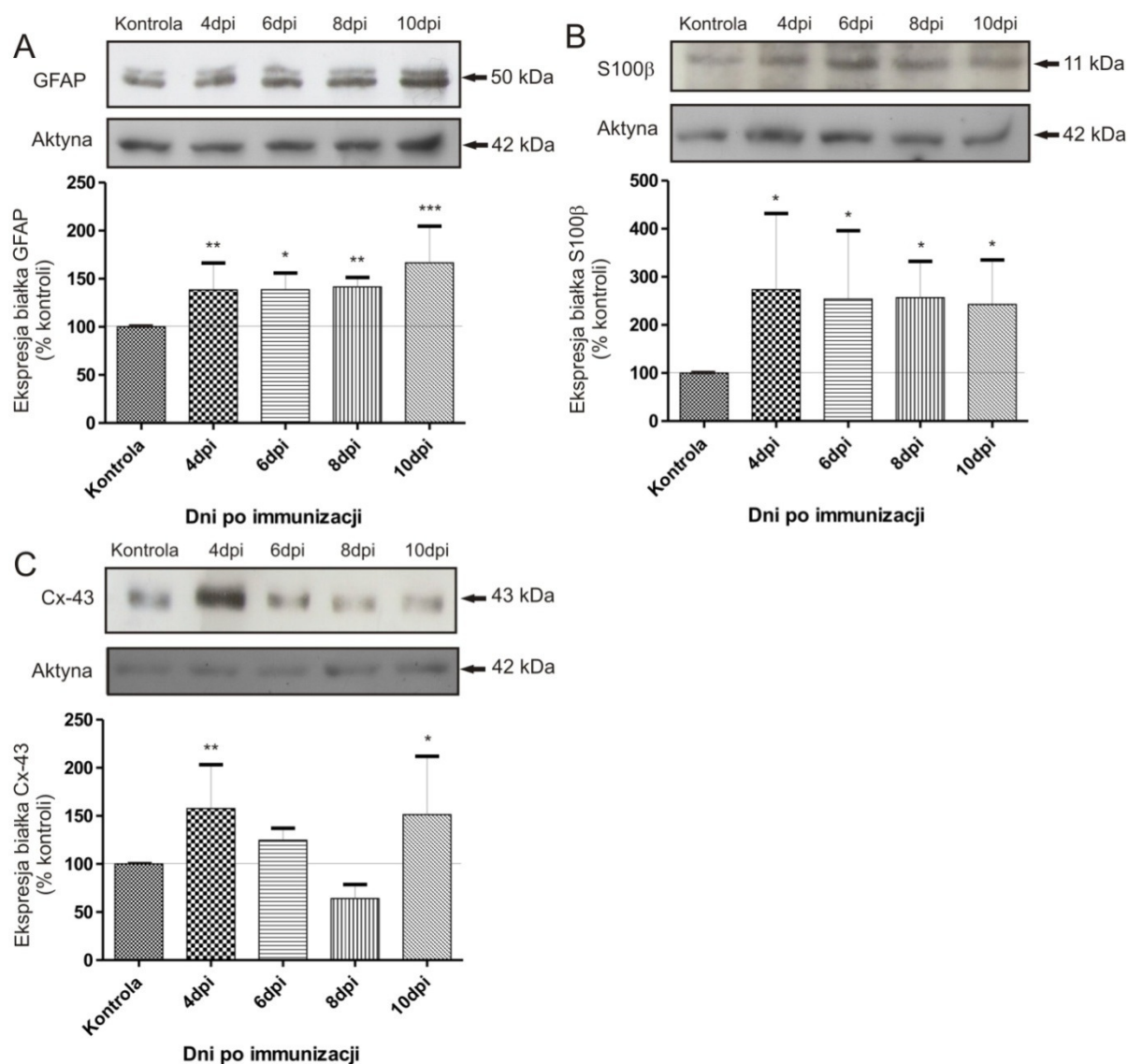


Rycina 24. Aktywacja astrocytów w trakcie rozwoju EAE. Skrawki mózgu poddano barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciała specyficznego dla białka GFAP (czerwony). Przykładowe obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiają czasowe zmiany immunofluorescencji białka GFAP oraz zmiany morfologii astrocytów. Od 4 dpi widoczna astroglioza oraz cechy aktywacji komórek: zwiększenie ilości wypustek i przerost komórek. Skala – 20 μ m.

Aktywacja astrocytów została potwierdzona badaniem Western blot markerów astrocytów takich jak GFAP i S100 β . Poziom tych białek u zwierząt z EAE ulegał zwiększeniu zarówno we wczesnych czasach po immunizacji (4-6 dpi), jak i w fazie objawowej (10 dpi). Poziom białka GFAP w 4 dpi wynosił 138% kontroli i wzrastał do 167% kontroli w 10 dpi (Ryc. 25 A). Ekspresja białka S100 β w 4 dpi osiągała 273% kontroli i utrzymywała się na podobnym poziomie w późniejszych czasach, wynosząc w 10 dpi 243% kontroli (Ryc. 25 B).

Astrocyty występują w OUN jako syncytium komórek połączonych ze sobą połączeniami szczelinowymi (ang. gap junctions), których głównym białkiem jest koneksyna 43. Reaktywne astrocyty wykazują nadekspresję tego białka (Theodoric i wsp. 2012), dlatego wybrano je dodatkowo do analizy stanu tych komórek. Badanie poziomu białka koneksyna 43 wykazało jego wzrost przede wszystkim w fazie bezobjawowej (4-6 dpi), ale również w fazie objawowej (10 dpi). W 4 dpi poziom koneksyny 43 podniósł się o 57% w stosunku do

wartości kontrolnych, w 6 dpi był nadal podwyższony o 25%, a w 8 dpi spadał do 64% wartości kontrolnych. W fazie objawowej ponownie wzrastał do poziomu 151% wartości kontrolnych (Ryc. 25 C). Według danych literaturowych istnieje związek pomiędzy wzrostem ekspresji koneksyny 43 i otwarciem hemikanałów tworzących połączenia międzykomórkowe (Cotrina i wsp. 1998), dlatego wynik ten może sugerować udział hemikanałów w uwalnianiu neurotoksycznych czynników takich jak ATP czy glutaminian z pobudzonych astrocytów.



Rycina 25. Względny poziom białek markerowych astrocytów: A) GFAP, B) S100β, C) Koneksyny 43 w homogenatach mózgow zwierząt kontrolnych i poddanych EAE w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywne immunobloty oraz wykresy przedstawiające wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. *** $P < 0,001$ vs. kontrola; ** $P < 0,01$ vs. kontrola; * $P < 0,05$ vs. kontrola. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.

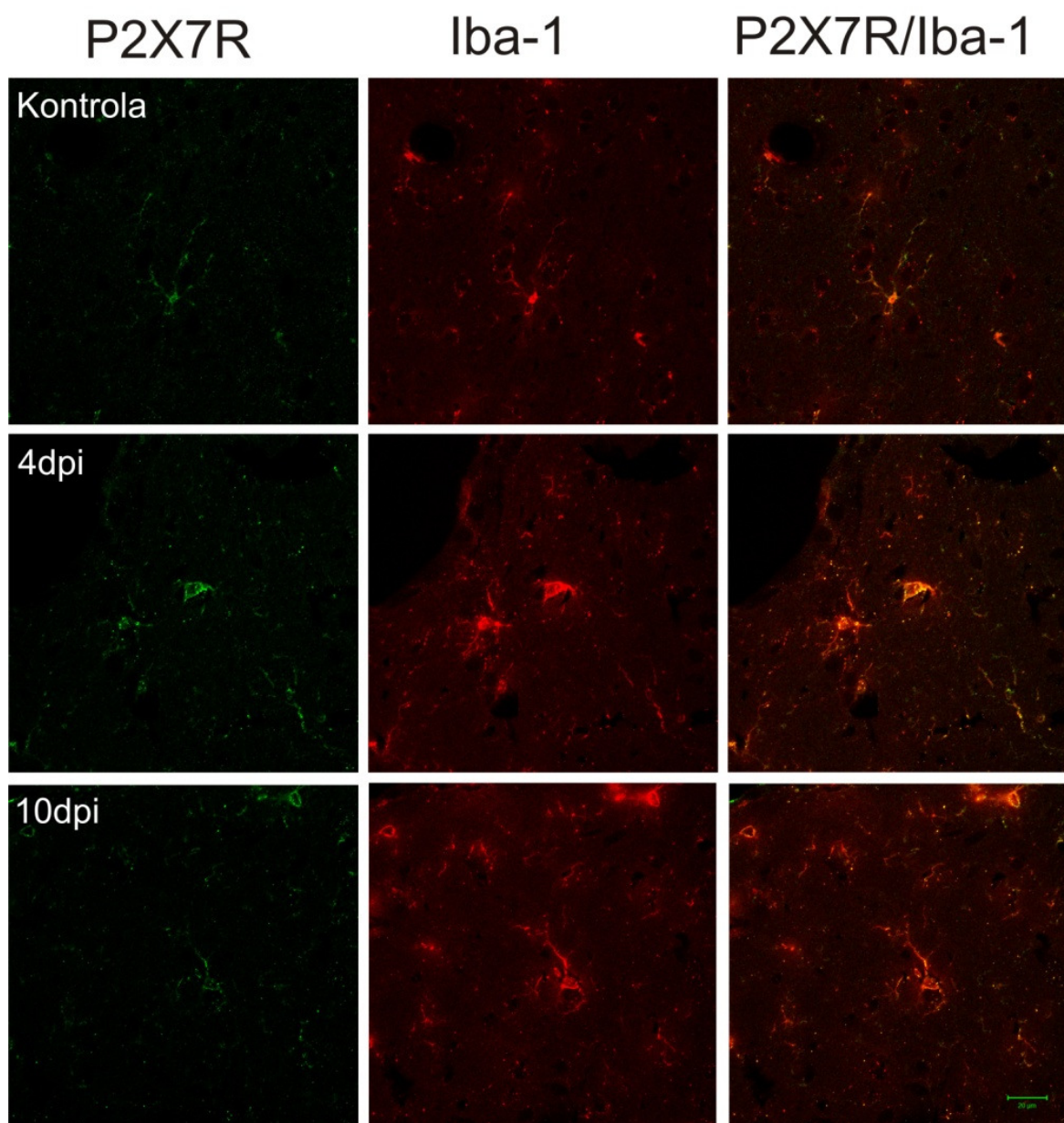
4.2.1.4. Ekspresja P2X7R w mikrogleju

Z powodu braku metody otrzymywania izolowanej frakcji mikroglejowej o wydajności umożliwiającej uzyskanie odpowiednio dużej ilości białka, poziom białka P2X7R w mikrogleju został zbadany jedynie metodą immunohistochemiczną przy użyciu podwójnego barwienia przeciwciałami skierowanymi przeciwko białku P2X7R oraz przeciwko białku charakterystycznemu dla komórek mikrogleju – Iba1 (ang. ionized calcium-binding adapter molecule 1). Badanie wykazało kolokalizację markera mikrogleju i receptora P2X7R. Zaobserwowano również wczesną (już 4 dpi) aktywację komórek mikrogleju i ich pomnożenie (Ryc. 26).

4.1.1.1. Ekspresja P2X7R w mikronaczyniach

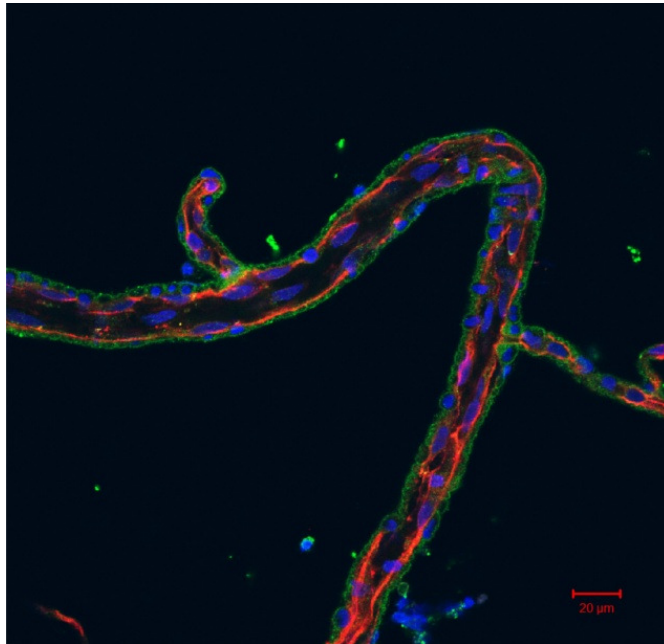
W danych literaturowych brak jest dotychczas informacji na temat występowania receptora P2X7 w mikronaczyniach mózgowych, chociaż obserwowano jego ekspresję w mikronaczyniach siatkówki oka szczura (Kawamura i wsp. 2003). Dlatego też w pierwszym etapie badań wykazano obecność tego receptora w mikronaczyniach izolowanych z mózgow szczurów kontrolnych. Immunofluorescencja odpowiadająca P2X7R lokalizowała się w warstwie zewnętrznej naczynia tj. w miejscu gdzie występują przynaczyniowe pericyty. Komórki te posiadają okrągłe jądra, w przeciwieństwie do podłużnych jąder komórek endotelialnych, tworzących podstawową warstwę mikronaczynia i będących anatomicznym miejscem bariery krew-mózg (BBB). Jest to cecha morfologiczna odróżniająca te dwa typy komórek. Komórki endotelialne połączone ze sobą połączeniami ścisłymi zidentyfikowano na podstawie obecności głównego białka wchodzącego w ich skład – kładyny 5 (Ryc. 27).

Wyniki potwierdzono poprzez podwójne barwienie immunohistochemiczne wobec P2X7R oraz PDGFR β (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β , ang. Platelet-derived growth factor receptor β). W obrębie mikronaczyń białko to jest charakterystyczne dla pericytów. Barwienie wykazało immunoreaktywność obu białek w obrębie komórek o morfologii pericytów (Ryc. 28).

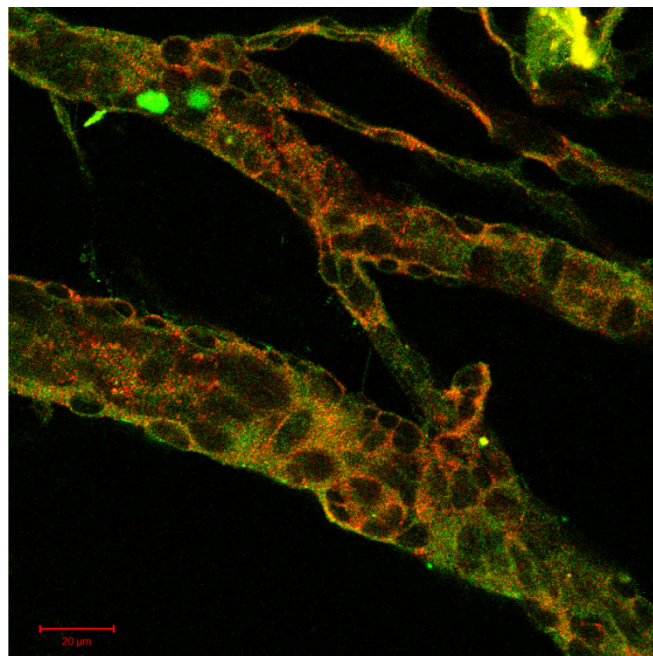


Rycina 26. Lokalizacja P2X7R w komórkach mikrogleju u zwierząt kontrolnych oraz poddanych EAE (4 i 10 dpi). Skrawki mózgow były poddane podwójnemu barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał specyficznych dla P2X7R (zielony) oraz dla białka Iba1 (czerwony). Przykładowe obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiają kolokalizację obu białek. Już w czwartym dniu po immunizacji (4 dpi) można zaobserwować zmiany morfologii komórek mikrogleju, świadczące o jego aktywacji tj. skrócenie i pogrubienie wypustek, hipertrofię. Zmiany te widoczne są również w 10 dpi. Skala – 20 μ m.

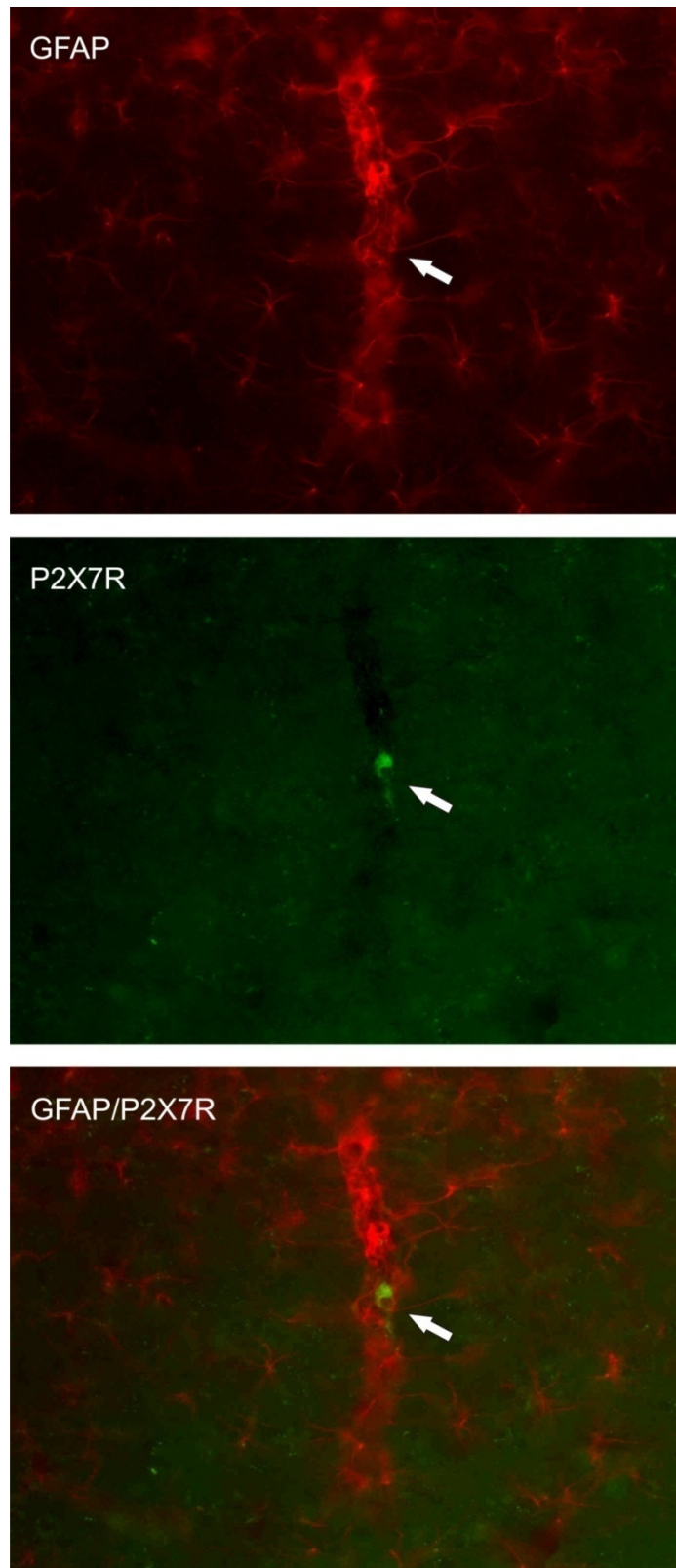
Komórki o morfologii pericytów wyznakowane przeciwciałem anty-P2X7R obserwowano także w naczyniach obecnych w skrawkach mózgowych szczurów kontrolnych. Przebieg naczyń zidentyfikowano na podstawie GFAP obecnego w wypustkach oplatających je astrocytów (Ryc. 29). Komórki wykazujące P2X7R przy jednoczesnym braku obecności markera astrocytów GFAP, występowały po zewnętrznej stronie naczynia od strony tkanki mózgu.



Rycina 27. Lokalizacja P2X7R w obrębie mikronaczynia mózgu szczura poddanego EAE. Izolowane naczynia poddane były potrójnemu barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał specyficznych dla P2X7R (zielony) i dla białka kładyna 5 (czerwony) oraz barwnika Hoechst 33342 dla jąder komórkowych (niebieski). Przykładowy obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawia lokalizację obu białek oraz jąder komórkowych. Immunofluorescencja specyficzna dla receptora P2X7 widoczna jest w zewnętrznej warstwie mikronaczynia. Skala – 20 µm.

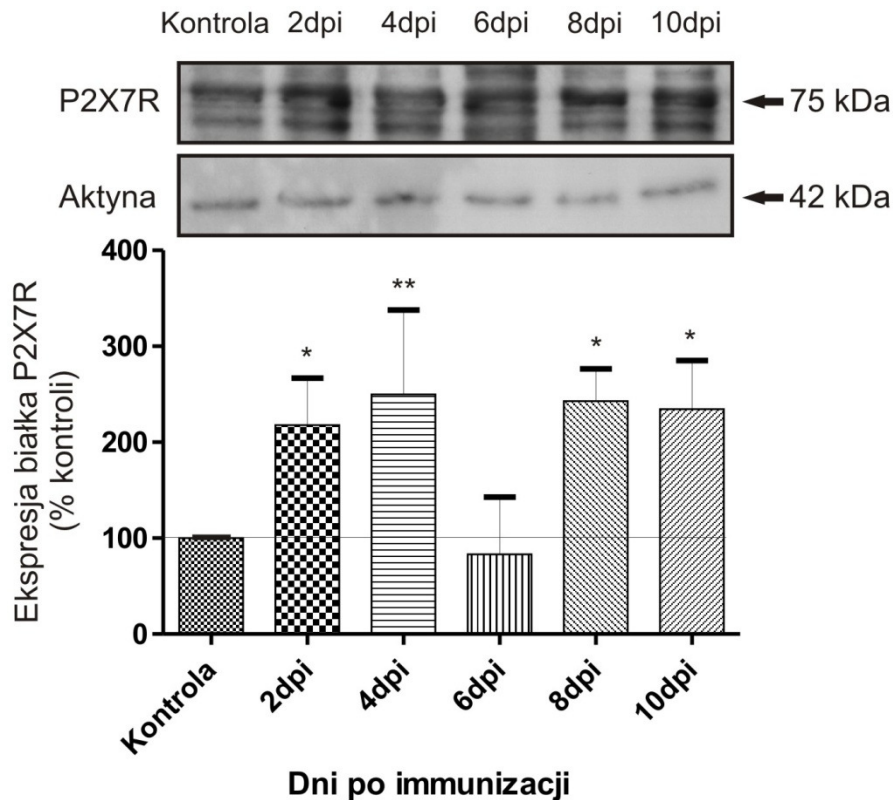


Rycina 28. Lokalizacja P2X7R w obrębie mikronaczynia mózgu szczura poddanego EAE. Izolowane naczynia poddane były podwójnemu barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał specyficznych dla P2X7R (zielony) i dla białka PDGFRβ (czerwony). Przykładowy obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawia lokalizację obydwu białek. Immunofluorescencja specyficzna dla receptora P2X7, podobnie jak dla PDGFRβ, widoczna jest po abluminalnej stronie mikronaczynia. Skala – 20 µm.



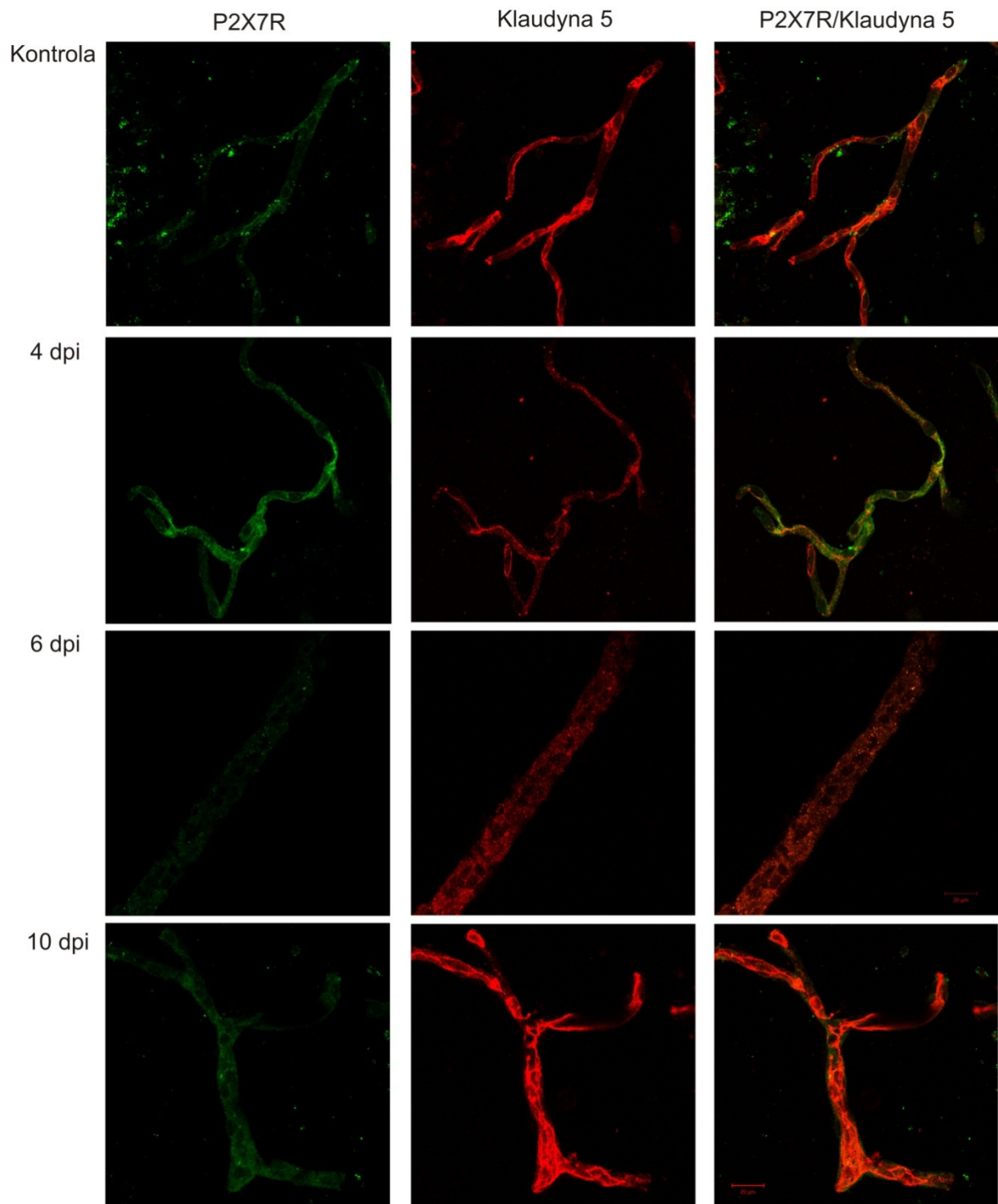
Rycina 29. Obecność P2X7R w obrębie mikronaczynia mózgu szczura kontrolnego. Skrawki mózgow były poddane podwójnemu barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał specyficznych dla P2X7R (zielony) oraz dla białka GFAP (czerwony). Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego obrazuje lokalizację obydwu białek. Strzałka wskazuje przykładową komórkę o morfologii pericytu, znajdującą się po stronie abluminalnej naczynia, wykazującą obecność białka P2X7R oraz brak obecności GFAP.

W trakcie rozwoju EAE poziom białka P2X7R w izolowanej frakcji naczyniowej wzrastał średnio o 123,6% w stosunku do kontroli, z wyjątkiem 6 dnia po immunizacji, kiedy zaobserwowano znaczny spadek poziomu białka receptora poniżej wartości kontrolnych (o 49%) (Ryc. 30).



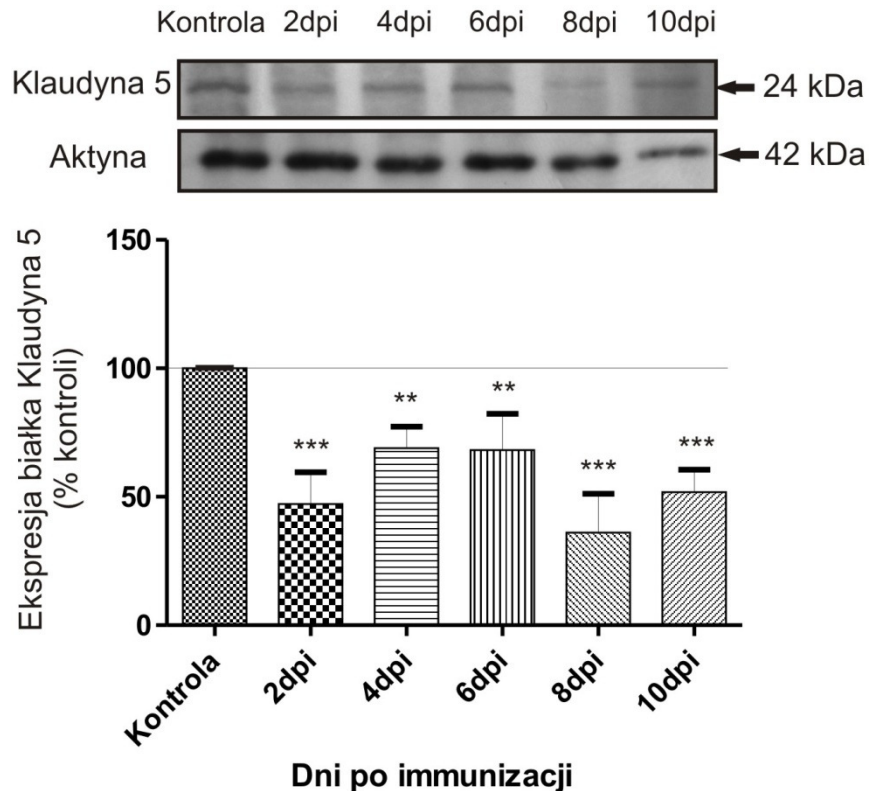
Rycina 30. Względny poziom białka P2X7R we frakcji mikronaczyń otrzymanych z mózgów szczurów kontrolnych i poddanych EAE w różnych czasach po immunizacji otrzymanej metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P < 0,01 vs. kontrola; *P < 0,05 vs kontrola (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli.

Podobny wzór zmian receptora obserwowano w barwieniach immunohistochemicznych we frakcji naczyń izolowanych z mózgów zwierząt poddanych EAE oraz zwierząt kontrolnych nieimmunizowanych (Ryc. 31). Obserwowany w 6 dpi spadek immunoreaktywności receptora P2X7 współwystępował ze zmniejszoną immunoreaktywnością kładyny 5 – białka BBB, markera ścisłych połączeń pomiędzy komórkami endotelium.



Rycina 31. Lokalizacja P2X7R w mikronaczyaniach izolowanych z mózgu szczura kontrolnego oraz poddanego EAE (4; 6 i 10 dpi). Frakcję izolowanych naczyń poddano podwójnemu barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał specyficznych dla P2X7R (zielony) oraz dla białka kładyna 5 (czerwony). Przykładowe obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiają lokalizację obydwu białek. Skala – 20 μ m.

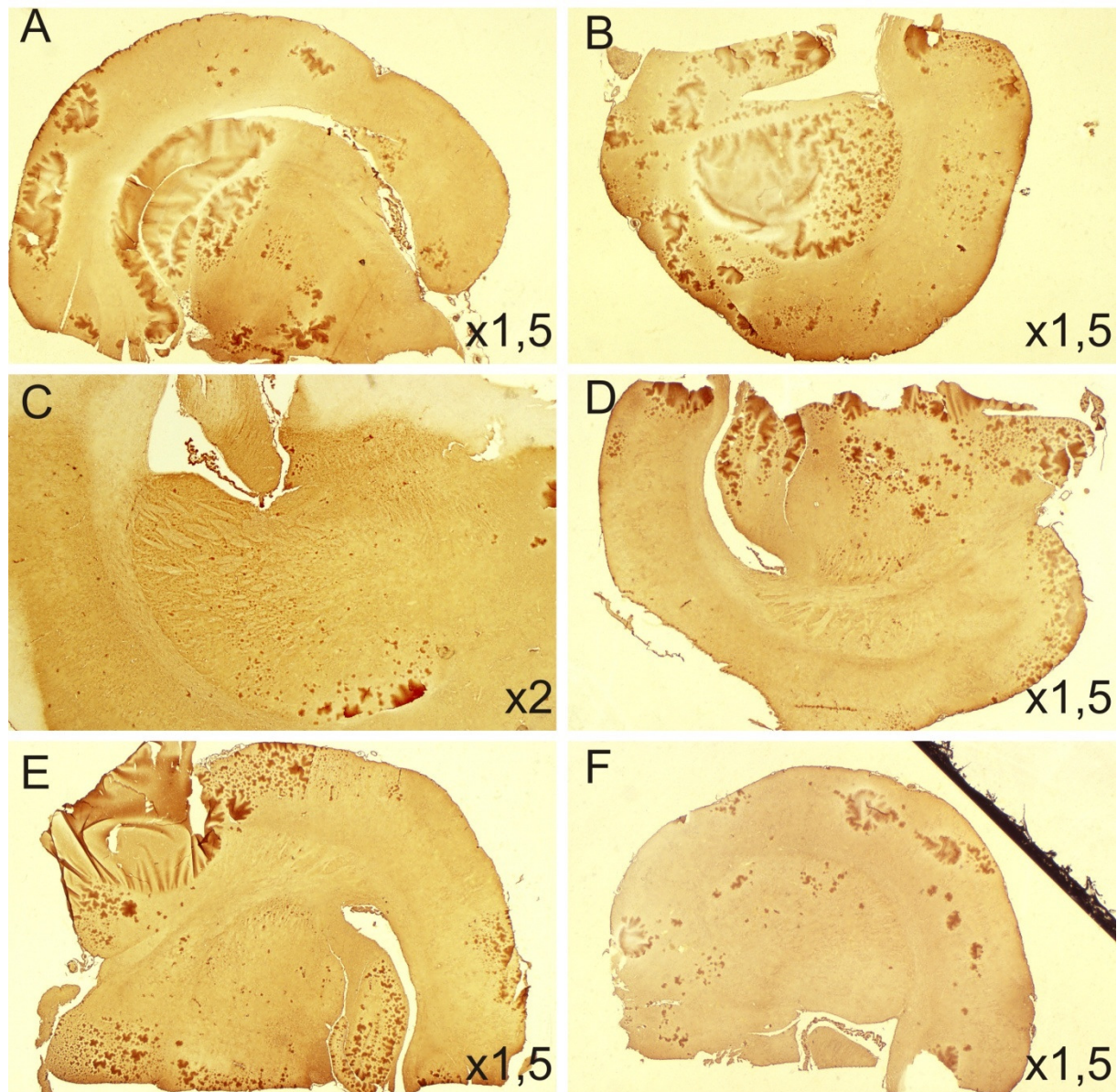
Badanie poziomu kładyny 5, białka markerowego bariery krew-mózg, w izolowanej frakcji naczyniowej wykazało, zgodnie z oczekiwaniami, spadek jego poziomu wraz z rozwojem EAE. W fazie bezobjawowej, począwszy od 2 dpi, poziom tego białka obniżał się o 36% - 69%, a w fazie objawowej (10 dpi) o 51% w stosunku do wartości kontrolnych (Ryc. 32). Może to świadczyć o nieprawidłowym funkcjonowaniu bariery krew-mózg związanej ze zwiększeniem jej przepuszczalności.



Rycina 32. Względny poziom białka kładyny 5 we frakcji mikronaczyń mózgowych w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. ***P <0,001 vs. kontrola; **P <0,01 vs. kontrola (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli.

Stan funkcjonalny bariery krew-mózg został potwierdzony z zastosowaniem barwienia histochemicznego, przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko szczerzej albuminie. W wyniku wzrostu przepuszczalności bariery krew-mózg, albumina ze światła naczyń krwionośnych może wydostawać się do tkanki mózgowej, co uwidacznia się w barwieniu w postaci zaciemnienia wokół naczyń krwionośnych. Obecność albuminy w tkance przynaczyniowej obserwowano już 4 dni po immunizacji w hipokampie, jądrach

podstawy i korze czołowej (Ryc. 33A, B). W fazie objawowej (10 dpi) wycieki albuminy z naczyń obecne były w rejonie hipokampa, osi, kory mózgowej oraz istoty białej (Ryc. 33E, F).



Rycina 33. Nieszczelność bariery krew-mózg w mikronaczyjniach mózgow szczerów poddanych EAE. Skrawki mózgow barwiono immunohistochemicznie z użyciem przeciwciał specyficznych dla albuminy. Zdjęcia z mikroskopu świetlnego obrazują pozanacyniową obecność albuminy, która w wyniku wzmożonej przepuszczalności bariery krew-mózg wydostała się ze światła naczynia do przestrzeni międzykomórkowej. A) 4 dpi, hipokamp. B) 4 dpi, jądra podstawy. C) 6 dpi, torebka zewnętrzna oraz wewnętrzna, istota biała. D) 8 dpi, hipokamp. E) 10 dpi, hipokamp, oś, kora mózgu. F) 10 dpi, kora, istota biała.

4.2. Pośrednia ocena aktywności P2X7R w przebiegu EAE na podstawie wybranych białek

4.2.1. Ekspresja paneksyny 1 w przebiegu EAE

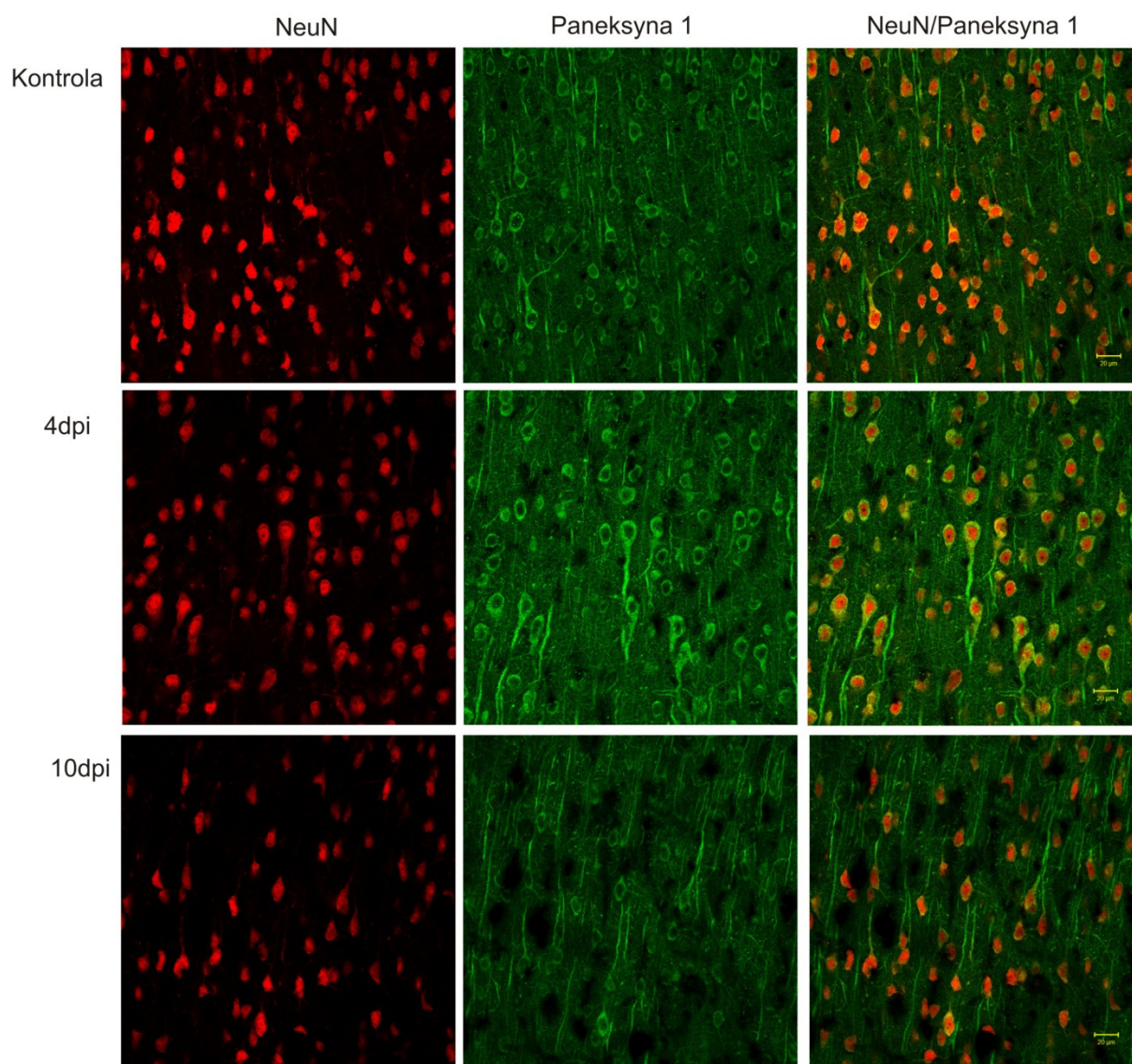
Jak wspomniano we wstępie, doniesienia literaturowe wykazują, że białko paneksyna 1 (Panx1) wchodzi w skład kompleksu białkowego budującego por błonowy, stanowiący składnik niezbędny do uruchomienia cytolitycznych właściwości białka P2X7R (Pelegriń i Surprenant 2006). Co więcej, funkcja kanałów paneksynowych jest ściśle związana ze stanem funkcjonalnym P2X7R. Aktywacja receptora P2X7R skutkująca tworzeniem inflamasomu i uwalnianiem prozapalnej cytokiny IL-1 β , jest zależna od aktywacji Panx1. Dlatego też, zarówno poziom tego białka jak i poziom cytokin prozapalnych mogą pośrednio odzwierciedlać pobudzenie receptora.

Badanie immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał anty-Panx1 oraz anty-NeuN (marker komórek nerwowych) wykazało wzrost immunoreaktywności białka Panx1 w neuronach w fazie bezobjawowej (4 dpi) w porównaniu do kontroli (Ryc. 34).

4.2.2. Poziom białka cytokin prozapalnych w przebiegu EAE

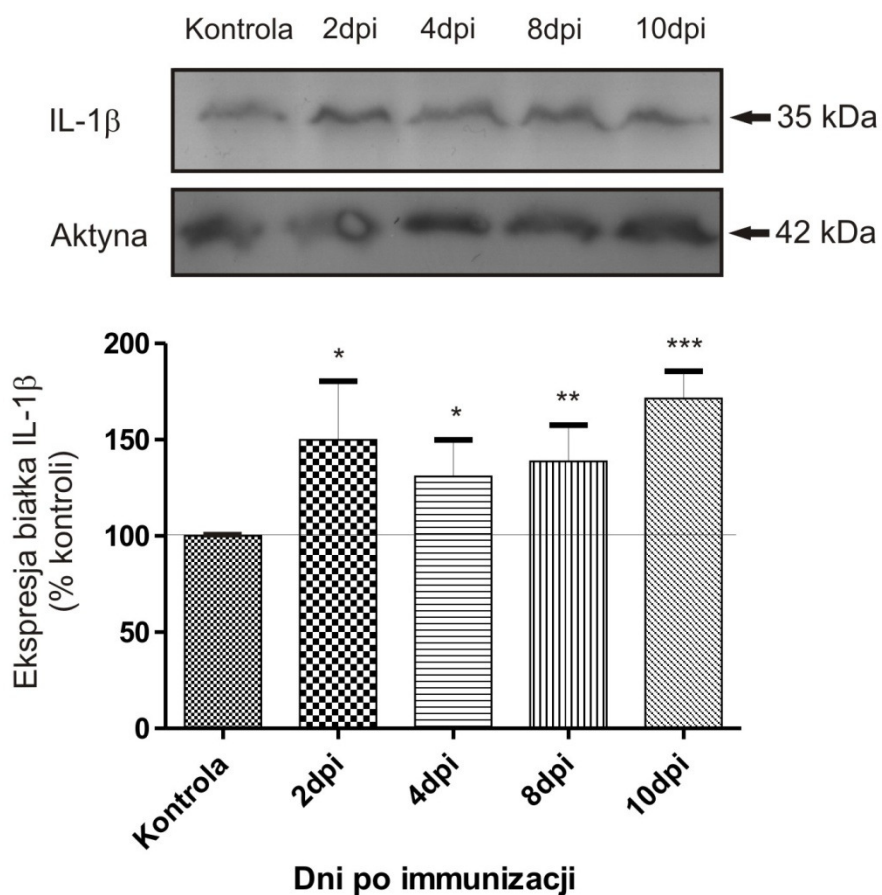
Ponieważ wiadomo, że efektem pobudzenia receptora P2X7 może być wydzielanie oraz „dojrzewanie” cytokin prozapalnych (Mariathasan i wsp. 2006), postanowiono sprawdzić poziom białka cytokin takich jak IL-1 β , TNF- α oraz IL-6 w homogenatach mózgów szczurów poddanych EAE, co pośrednio pozwoliło ocenić stopień aktywności tego receptora.

Interleukina 1 β występuje w komórce w formie nieaktywnej o wielkości 35 kDa, natomiast w wyniku pobudzenia enzymów aktywujących dochodzi do cięcia proteolitycznego formy nieaktywnej i wytworzenia formy aktywnej o wielkości 18 kDa. Zbadano poziom białka zarówno formy aktywnej jak i formy prekursorowej interleukiny 1 β . Zaobserwowano wzrost ekspresji prekursorowej formy IL-1 β już 2 dni po immunizacji o 50% w stosunku do wartości kontrolnych. Podwyższony poziom utrzymywał się do momentu wystąpienia fazy objawowej (Ryc. 35).

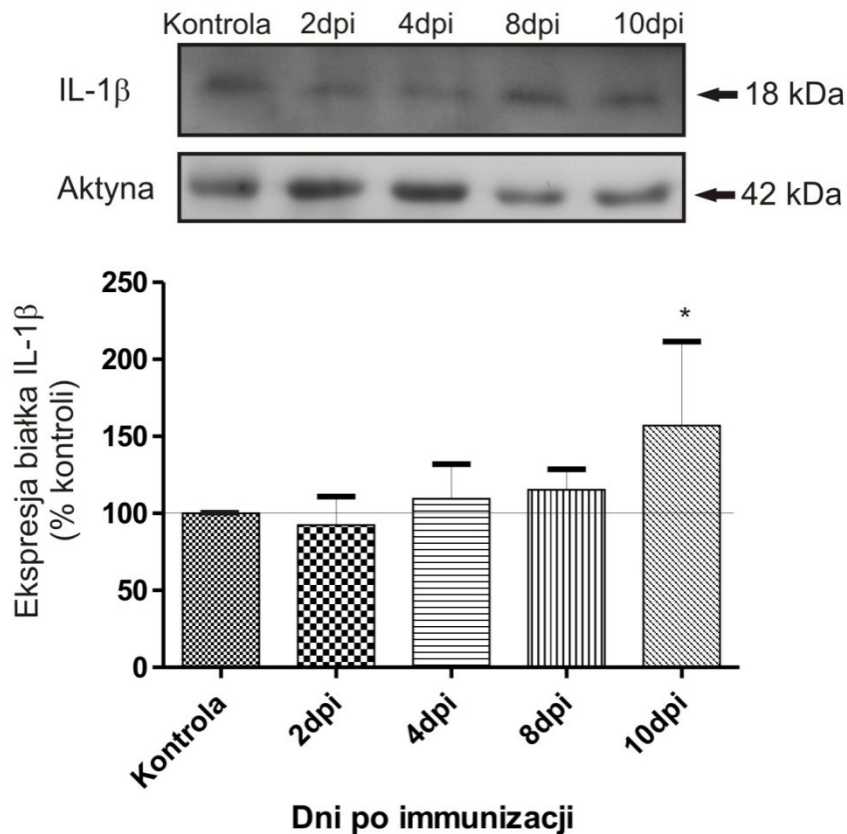


Rycina 34. Neuronalna ekspresja białka paneksyna 1 u zwierząt kontrolnych oraz zwierząt poddanych EAE (4 i 10 dpi). Skrawki mózgow były poddane podwójnemu barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał specyficznych dla Panx1 (zielony) oraz dla białka NeuN (czerwony). Przykładowe obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiają kolokalizację obydwu białek oraz wzmożoną immunoreaktywność Panx1 w 4 dpi u zwierząt z EAE. Skala – 20 μ m.

Poziom aktywnej formy IL-1 β wzrastał stopniowo, osiągając maksymalny poziom wynoszący 157% wartości kontrolnej w 10 dpi tj. w fazie objawowej (Ryc. 36).

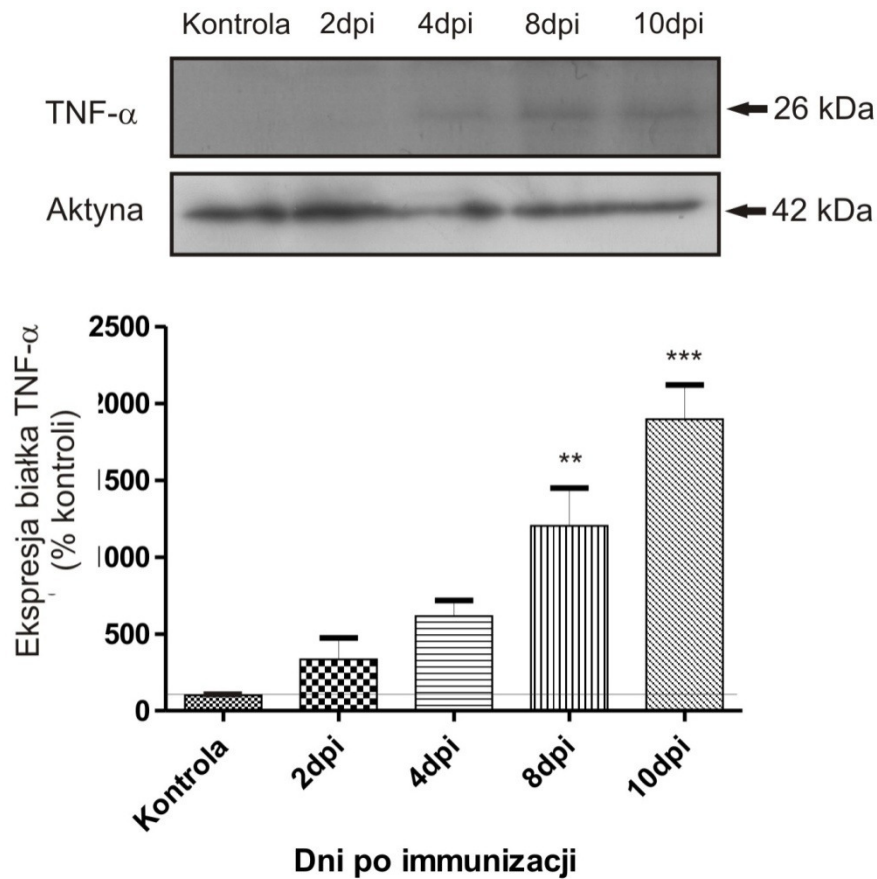


Rycina 35. Zmiany poziomu białka prekursorowej formy cytokiny prozapalnej IL-1 β (35 kDa) w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. ***P < 0,001 vs. kontrola; **P < 0,01 vs. kontrola; *P < 0,05 vs. kontrola (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.

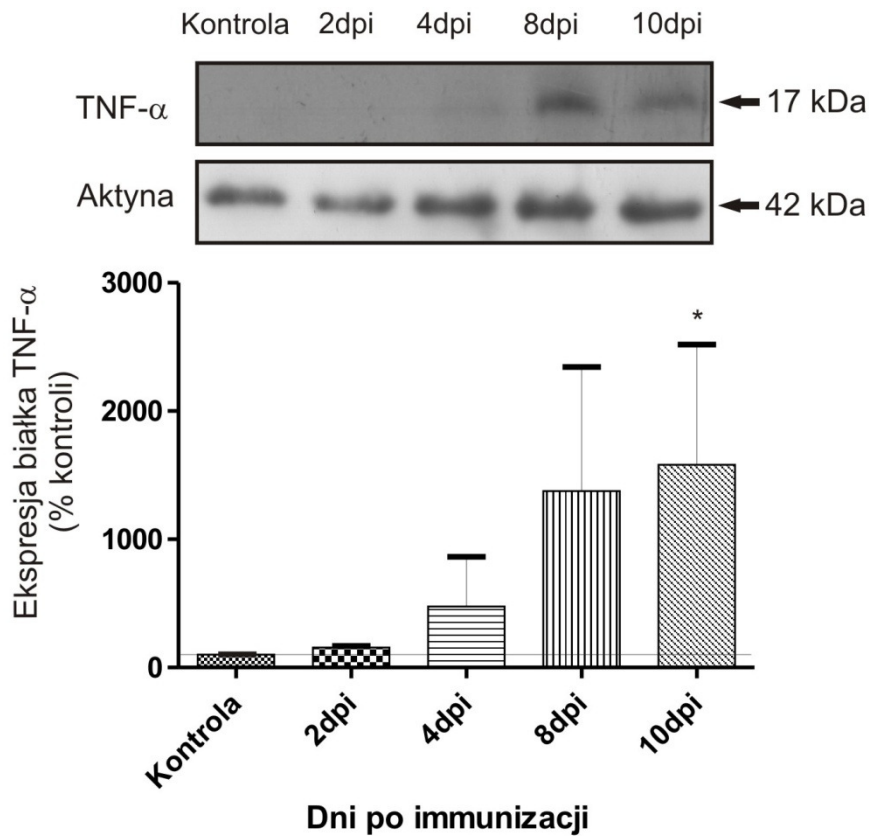


Rycina 36. Zmiany poziomu białka cytokiny prozapalnej IL-1 β 18 kDa w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. *P < 0,05 vs. kontrola (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.

Poziom białka prekursora dla interleukiny **TNF- α** wzrastał już 2 dnia po immunizacji do poziomu 333% kontroli i osiągał maksymalną wartość 1898% kontroli w fazie objawowej (10 dpi) (Ryc. 37). Ekspresja formy aktywnej tej cytokiny wzrastała począwszy od 4 dpi, osiągając poziom średnio 476% wartości kontrolnych. Najwyższy poziom zaobserwowano w fazie objawowej i wynosił on 1481% kontroli (Ryc. 38).

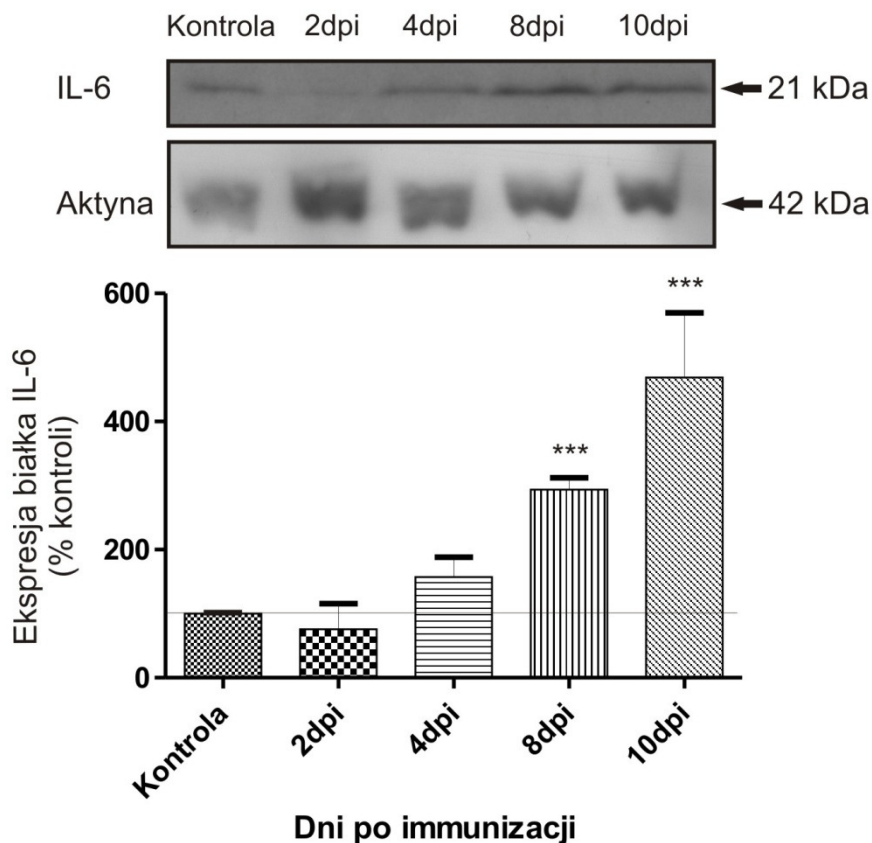


Rycina 37. Zmiany poziomu białka cytokiny prozapalnej TNF- α 26 kDa w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. ***P <0,001 vs. kontrola; **P <0,01 vs. kontrola (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.



Rycina 38. Zmiany poziomu białka cytokiny prozapalnej TNF- α 17 kDa w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. *P < 0,05 vs. kontrola (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.

Poziom białka interleukiny **IL-6** wzrastał od 4 dpi, osiągając w fazie objawowej (10 dpi) poziom 468% wartości kontrolnych (Ryc. 39).



Rycina 39. Zmiany poziomu białka IL-6 w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, w różnych czasach po immunizacji, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. *** $P < 0,001$ vs. kontrola (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta). Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.

Podsumowując część badań dotyczącą zmian ekspresji P2X7R należy podkreślić, że ekspresja receptora na poziomie mRNA wzrasta w fazie objawowej EAE, podczas gdy poziom białka ulega zwiększeniu już w fazie bezobjawowej choroby i jest on związany z pulą komórek astrocytarnych, które ulegają wczesnej aktywacji. Równolegle następuje aktywacja komórek mikrogleju, na których również stwierdzono obecność białka P2X7R. Ponadto, po raz pierwszy wykazano obecność P2X7R w pericytach mikronaczyń mózgowych. Wzrost ekspresji P2X7R zachodzi równolegle z jego aktywacją, co potwierdza wzrost ekspresji białka Panx1 oraz białka cytokin prozapalnych.

4.3. Ocena wpływu antagonisty P2X7R – Brilliant Blue G – na rozwój i przebieg EAE oraz wybrane procesy patologiczne w przebiegu choroby

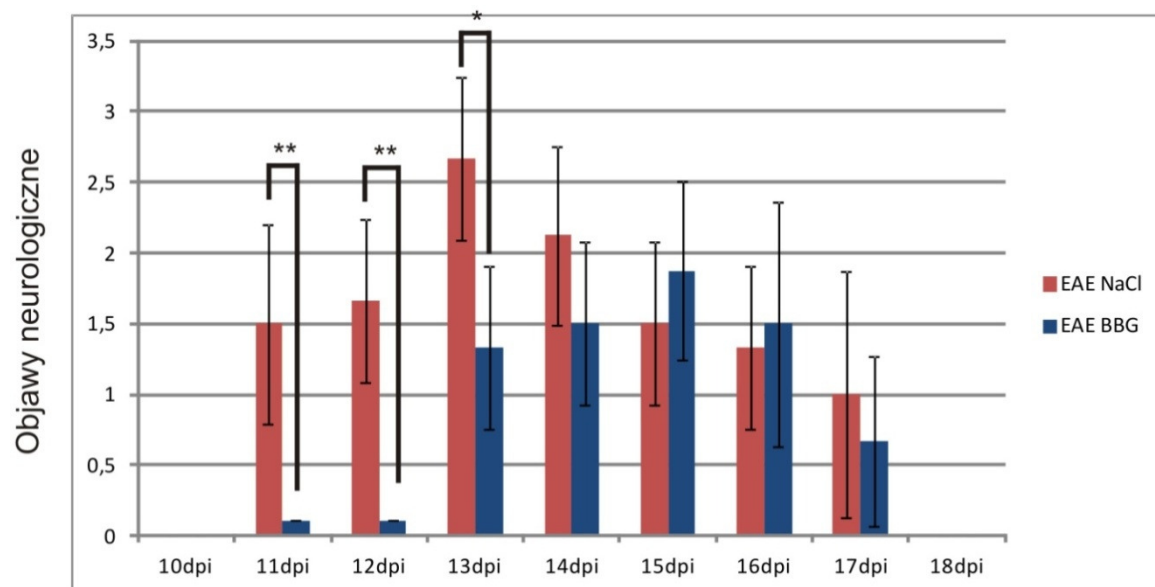
4.3.1. Wpływ podania BBG na przebieg fazy objawowej EAE

Otrzymane wyniki sugerują zaangażowanie receptora P2X7 w niektóre z patomechanizmów związanych z rozwojem i przebiegiem EAE. Weryfikację tej hipotezy zaplanowano w doświadczeniach z wykorzystaniem specyficznego antagonisty P2X7R - BBG. W tym celu szczury zostały podzielone na grupy opisane w rozdziale Materiały i metody (3.4).

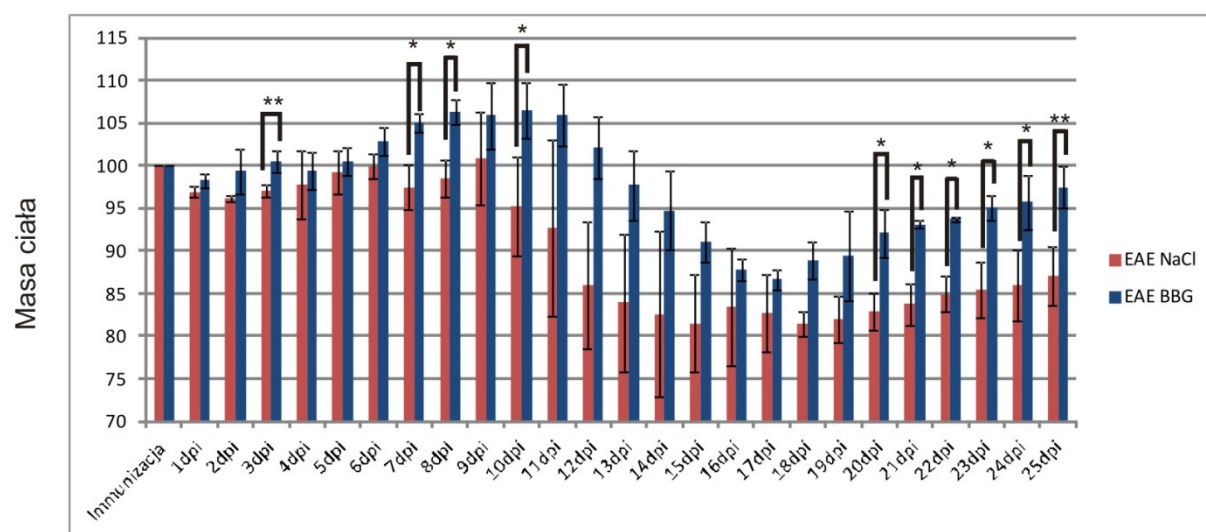
Szczury ze wszystkich grup były obserwowane codziennie pod względem rozwijających się deficytów neurologicznych oraz zmian masy ciała. Zwierzęta z grupy kontrolnej, którym podano sól fizjologiczną zamiast BBG (EAE+NaCl) rozwijały objawy w podobny sposób do zwierząt z grupy EAE. Rozwój deficytów neurologicznych w grupie traktowanej antagonistą w stosunku do grupy nietraktowanej został przedstawiony na rycinie 40. Zwierzęta, którym podano BBG słabiej rozwijały objawy EAE (1-2,5 punkty w skali deficytów neurologicznych) niż te z grupy EAE+NaCl (max. 3 punkty). Czas wystąpienia pierwszych objawów był również opóźniony (dzień 11 w grupie EAE+NaCl i dzień 13 po immunizacji w grupie EAE+BBG), podobnie jak szczyt wystąpienia objawów przypadający w grupie zwierząt, którym podano BBG na 15 dpi, podczas gdy u zwierząt z EAE szczyt objawów występował średnio w 13 dpi (Ryc. 40).

Zmiany masy ciała zwierząt w obu grupach w początkowej fazie EAE zostały przedstawione na rycinie 41. Masa ciała zwierząt poddanych EAE (EAE+NaCl) jak i tych, którym podano BBG w dniu immunizacji, przejściowo zmniejszyła się. Zwierzęta z grupy EAE+NaCl w drugiej dobie po immunizacji osiągały średnio 96% masy ciała z dnia 0 dpi. Następnie masa ciała tych zwierząt powoli rosła do dnia 6 dpi, osiągając 100% masy ciała z dnia 0 dpi. W kolejnych dniach masa ciała zwierząt ponownie stopniowo spadała, osiągając najniższy poziom w 15 dpi (81,5% masy ciała z dnia 0 dpi). Począwszy od 16 dpi masa ciała stopniowo rosła, aby na koniec trwania doświadczenia osiągnąć 87% masy ciała z dnia 0 dpi. Masa ciała zwierząt, którym podano BBG w fazie bezobjawowej, w 1 dpi spadła do poziomu 98% dnia 0 dpi, następnie zaczęła stopniowo wzrastać, osiągając w dniu 10 dpi 106% masy z dnia 0 dpi. Następnie masa ciała zmniejszała się, osiągając najniższy poziom 17 dpi, (ok. 87%

masy z dnia 0). W kolejnych dniach trwania eksperymentu masa ciała rosta, osiągając w dniu 25 dpi 97% masy z dnia 0 dpi (Ryc. 41). Podanie antagonisty wyraźnie hamowało spadek masy ciała w przebiegu EAE, szczególnie pomiędzy 7 a 14 dpi oraz pomiędzy 20 a 25 dpi.



Rycina 40. Profil czasowy rozwoju deficytów neurologicznych oraz ich skala u zwierząt z wywołanym EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 – BBG (EAE+BBG) lub sól fizjologiczną (EAE+NaCl). Wykres przedstawia wartość średnie \pm SD z pomiarów masy ciała zwierząt, n=8; ***P < 0,01; *P < 0,05. Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą testu t-Studenta względem grupy zwierząt, którym nie podano antagonisty receptora P2X7.



Rycina 41. Profil czasowy zmian masy ciała zwierząt u zwierząt z wywołanym EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 – BBG (EAE+BBG) lub sól fizjologiczną (EAE+NaCl). Wykres przedstawia wartość średnie \pm SD z pomiarów masy ciała zwierząt otrzymanych z 6 niezależnych doświadczeń. ***P < 0,01; *P < 0,05. Różnice wewnątrzgrupowe oceniano przy użyciu testu t-Studenta.

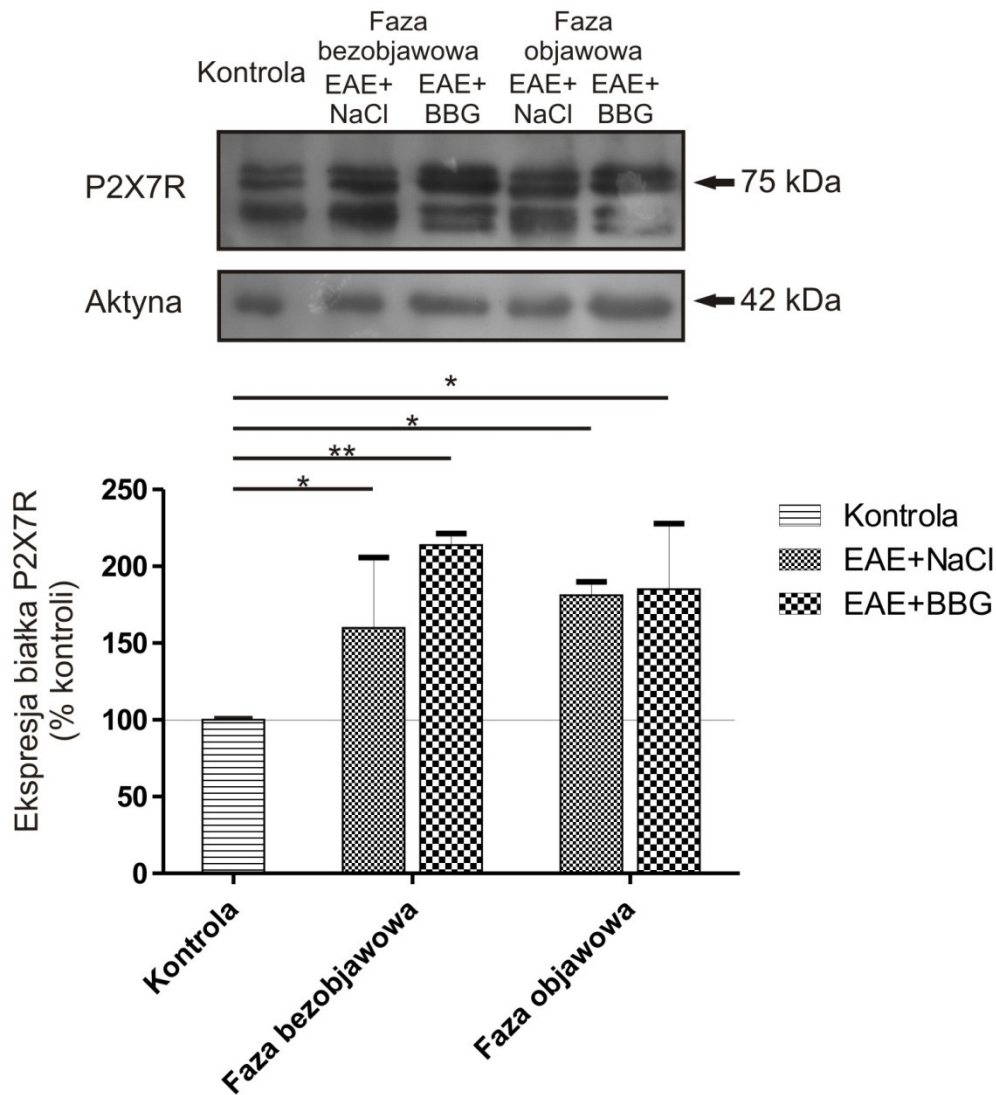
4.3.2. Wpływ podania BBG na poziom białka P2X7R

Poziom białka P2X7R w fazie bezobjawowej jak i objawowej, po podaniu BBG nie zmieniał się w sposób istotny statystycznie w stosunku do poziomu obserwowanego u szczurów z grupy EAE+NaCl, choć w fazie bezobjawowej obserwowano tendencję wzrostową (160% kontroli dla grupy EAE+NaCl vs. 214% dla grupy EAE+BBG). W fazie objawowej ekspresja wyniosła 181% dla grupy EAE+NaCl i 185% dla grupy EAE+BBG. Ponieważ nie zaobserwowano znamienych statystycznie różnic pomiędzy grupą EAE+NaCl a EAE+BBG, dlatego też nie przeprowadzono dalszej szczegółowej analizy ekspresji P2X7R w poszczególnych pulach komórkowych mózgu szczura (Ryc. 42).

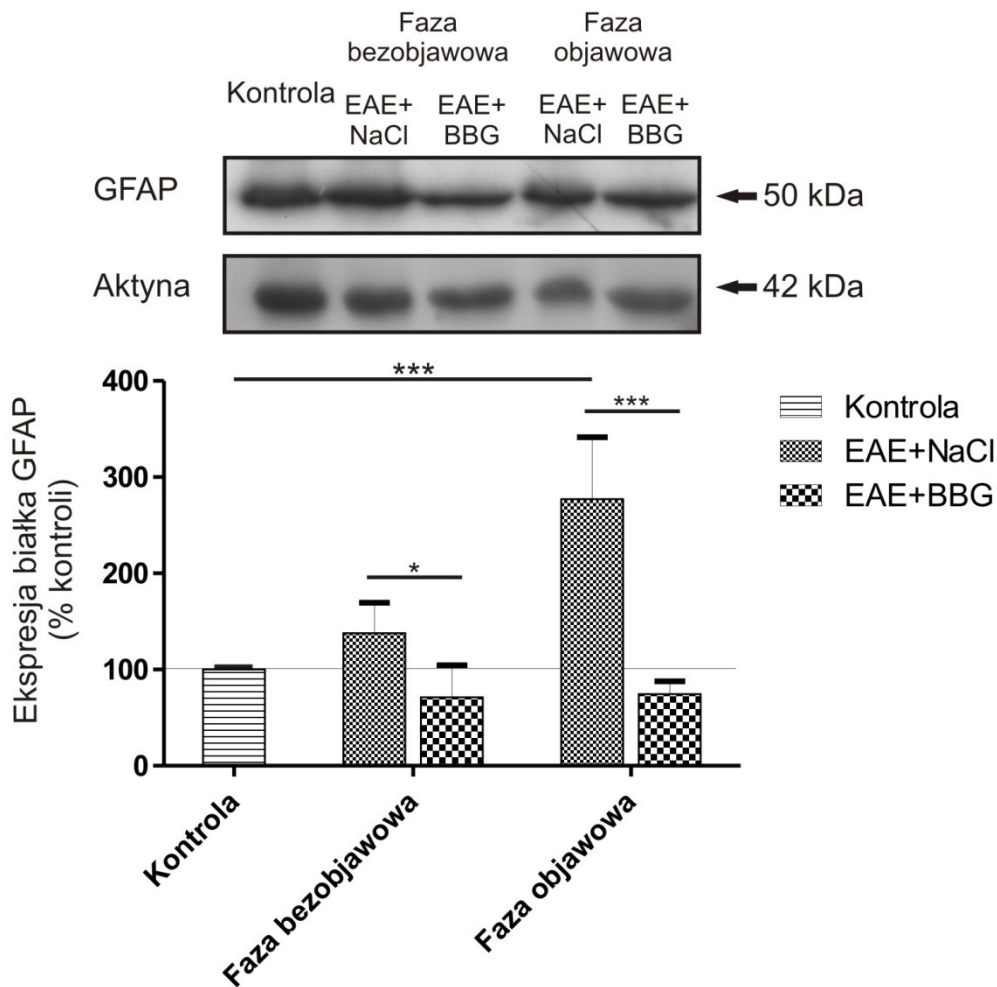
4.3.3. Wpływ podania antagonisty P2X7R na aktywację astrocytów

Jak wykazano w niniejszej pracy, astrocyty w trakcie rozwoju EAE podlegają aktywacji. Już w czwartym dniu po immunizacji cechuje je wzrost ekspresji białka GFAP – będącego markerem tych komórek i jednocześnie markerem aktywacji. Podanie antagonisty receptora P2X7 spowodowało zahamowanie aktywacji astrogleju wyrażone spadkiem ekspresji białka GFAP. Potwierdzono to badaniem metodą Western blot w homogenatach mózgow szczerów kontrolnych poddanych EAE, którym podano NaCl oraz poddanych EAE, którym podano BBG, jak również badaniem immunohistochemicznym na skrawkach mózgowych badanych grup zwierząt.

Badanie Western blot wykazało w fazie bezobjawowej EAE wzrost poziomu białka GFAP o 38% w stosunku do wartości kontrolnych, gdy w tym samym czasie w grupie szczurów, którym podawano BBG poziom białka GFAP wynosił jedynie 71% wartości kontrolnych. W fazie objawowej poziom GFAP w grupie EAE+NaCl był wyższy o 177% od wartości kontrolnych, podczas gdy w grupie EAE+BBG był niższy o 26% (Ryc. 43). Podanie antagonisty hamowało wzrost poziomu GFAP o 57% w fazie bezobjawowej i o ponad 200% w fazie objawowej.



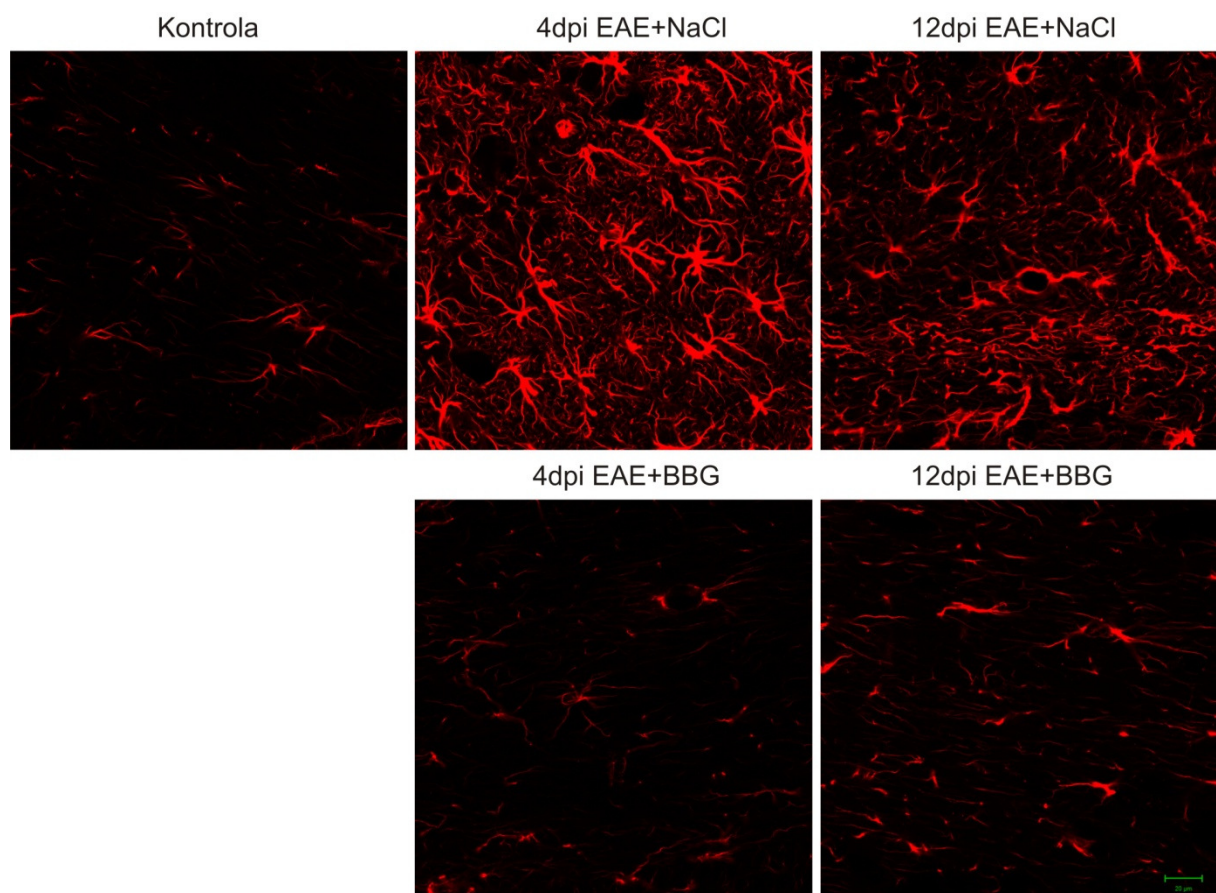
Rycina 42. Względny poziom białka P2X7R w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, którym podano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 - BBG, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P < 0,01 vs. kontrola; *P < 0,05 vs. kontrola. Różnice pomiędzy grupami badanymi a kontrolą oceniono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Różnice wewnątrzgrupowe oceniono przy użyciu testu t-Studenta. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli.



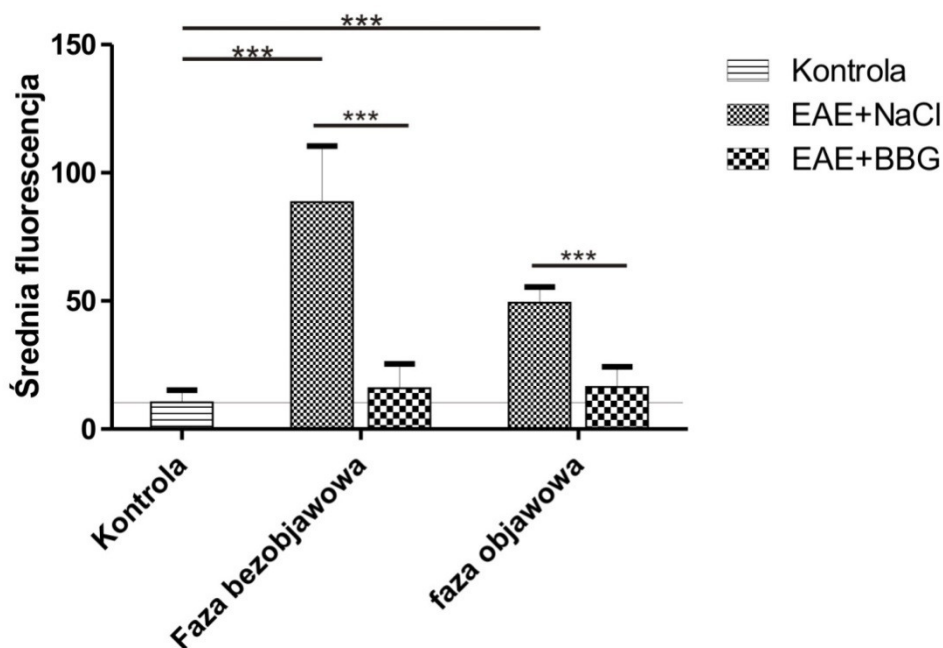
Rycina 43. Względny poziom białka GFAP w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE którym podawano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 - BBG, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. ***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05 vs. kontrola. Różnice pomiędzy grupami badanymi a kontrolą pomiędzy grupami badanymi a kontrolą oceniono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Różnice wewnątrzgrupowe oceniono przy użyciu testu t-Studenta. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli.

Wyniki te zostały potwierdzone badaniem immunohistochemicznym, które wykazało wzrost immunoreaktywności białka GFAP w obydwu fazach choroby oraz morfologiczne cechy pobudzenia astrocytów. U zwierząt z grupy EAE+NaCl można zaobserwować pogrubienie wypustek komórkowych oraz zwiększenie ich ilości (Ryc. 44 górny panel zdjęć). W skrawkach mózgów zwierząt, którym w fazie bezobjawowej podawano BBG, zaobserwowano jedynie nieznaczny wzrost immunoreaktywności białka GFAP oraz niewielkie zmiany morfologii komórek (Ryc. 44 dolny panel zdjęć).

Immunoreaktywność antygenu GFAP zmierzono i wyrażono jako średni poziom fluorescencji. W skrawkach mózgow zwierząt z grupy EAE+NaCl parametr ten wzrastał zarówno w fazie bezobjawowej jak i objawowej i był wyższy odpowiednio o 751,15% i 374,49% od wartości kontrolnych. U zwierząt, którym podano antagonistę receptora P2X7 – BBG, średni poziom fluorescencji obniżał się do wartości kontrolnych już w fazie bezobjawowej (Ryc 45).



Rycina 44. Aktywacja astrocytów w trakcie rozwoju EAE przy podawaniu NaCl (górny panel) oraz u zwierząt, którym po wywołaniu EAE podano antagonistę receptora P2X7 – BBG (dolny panel). Skrawki mózgow były poddane barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciała specyficznego dla białka GFAP (czerwony). Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiają zmiany immunoreaktywności białka GFAP, pomnożenie liczby komórek oraz zmiany morfologii astrocytów charakterystyczna dla stanu aktywnego, u zwierząt poddanych EAE zarówno w fazie bezobjawowej (4 dpi) jak i objawowej (12 dpi) EAE (górny panel). U zwierząt, którym podano BBG brak większych zmian w morfologii komórek oraz immunoreaktywności białka GFAP. Skala – 20 μ m.

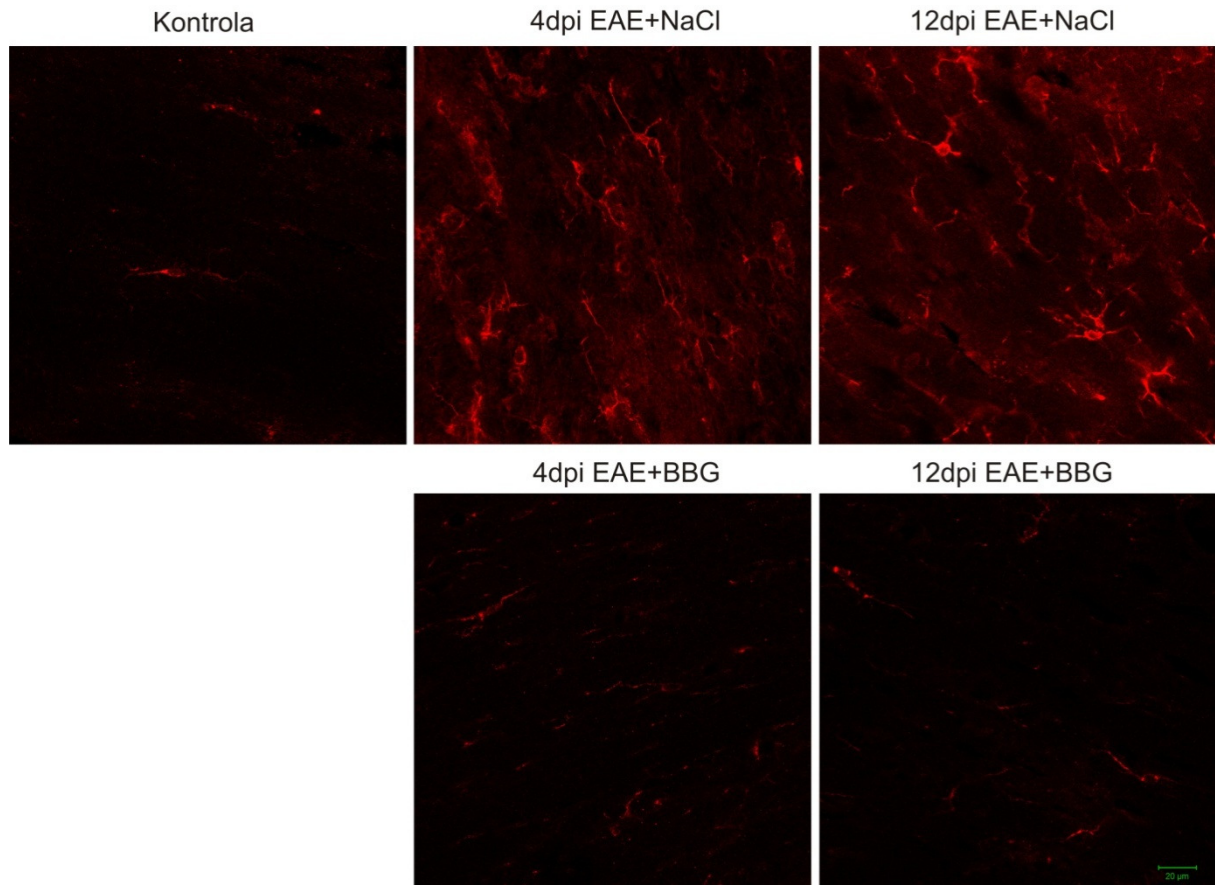


Rycina 45. Poziom średniej fluorescencji GFAP mierzony w skrawkach mózgow zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, którym podawano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 - BBG, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany w barwieniu immunohistochemicznym. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD z pomiarów średniej fluorescencji w obrazach. ***P <0,001 vs. kontrola bądź vs. EAE+NaCl. Różnice pomiędzy grupami badanymi a kontrolą oceniono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Różnice wewnątrzgrupowe oceniono przy użyciu testu t-Studenta.

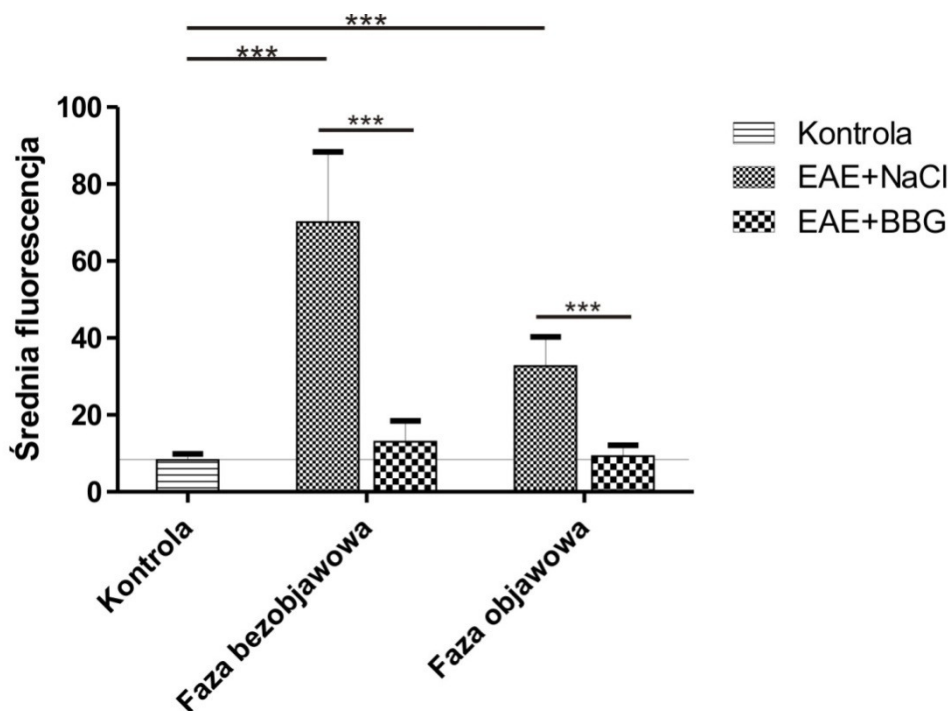
4.3.4. Wpływ podania antagonisty P2X7R na aktywację mikrogleju

Wpływ blokowania aktywności receptora P2X7 przez specyficznego antagonistę - BBG na aktywację mikrogleju został wykazany za pomocą barwienia immunohistochemicznego. Obserwowano zahamowanie aktywacji mikrogleju w mózgu szczurów z grupy EAE+BBG, które skutkowało brakiem znamion morfologicznych stanu aktywnego w badanych punktach czasowych. Immunoreaktywność Iba1 pozostawała na poziomie obserwowanym u zwierząt kontrolnych (Ryc. 46 – dolny panel). Natomiast w modelu EAE (grupy EAE+NaCl) obserwowano aktywację komórek mikroglejowych począwszy od fazy bezobjawowej. Obserwowano wzrost liczby komórek mikrogleju, wzrost immunoreaktywności białka markerowego komórek mikrogleju – Iba1 oraz zmiany morfologii tych komórek, polegające na skróceniu wypustek cytoplazmatycznych, ich pogrubieniu oraz zwiększeniu ich ilości (Ryc. 46 - górny panel).

Poziom immunoreaktywności białka Iba1 został zmierzony za pomocą średniej fluorescencji (Ryc. 47). Fluorescencja w obrazach mikroskopowych w fazie bezobjawowej u zwierząt traktowanych BBG była 7-krotnie niższa niż u zwierząt, które nie otrzymywały BBG, a w fazie objawowej 3-krotnie niższa (Ryc. 47).



Rycina 46. Aktywacja mikrogleju w trakcie rozwoju EAE (górny panel) oraz u zwierząt, którym podano antagonistę receptora P2X7 – BBG (dolny panel). Skrawki mózgow były poddane barwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciała specyficznego dla białka Iba1 (czerwony). Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiają immunoreaktywność białka Iba1 oraz zmiany morfologii komórek mikrogleju. Widoczna aktywacja mikrogleju, pomnożenie komórek oraz zmiana morfologii wraz ze wzrostem immunoreaktywności białka Iba1 u zwierząt poddanych EAE zarówno w fazie bezobjawowej, jak i objawowej EAE (górny panel). U zwierząt, którym podano BBG brak większych zmian w morfologii komórek oraz w immunoreaktywności białka Iba1. Skala – 20 μm.



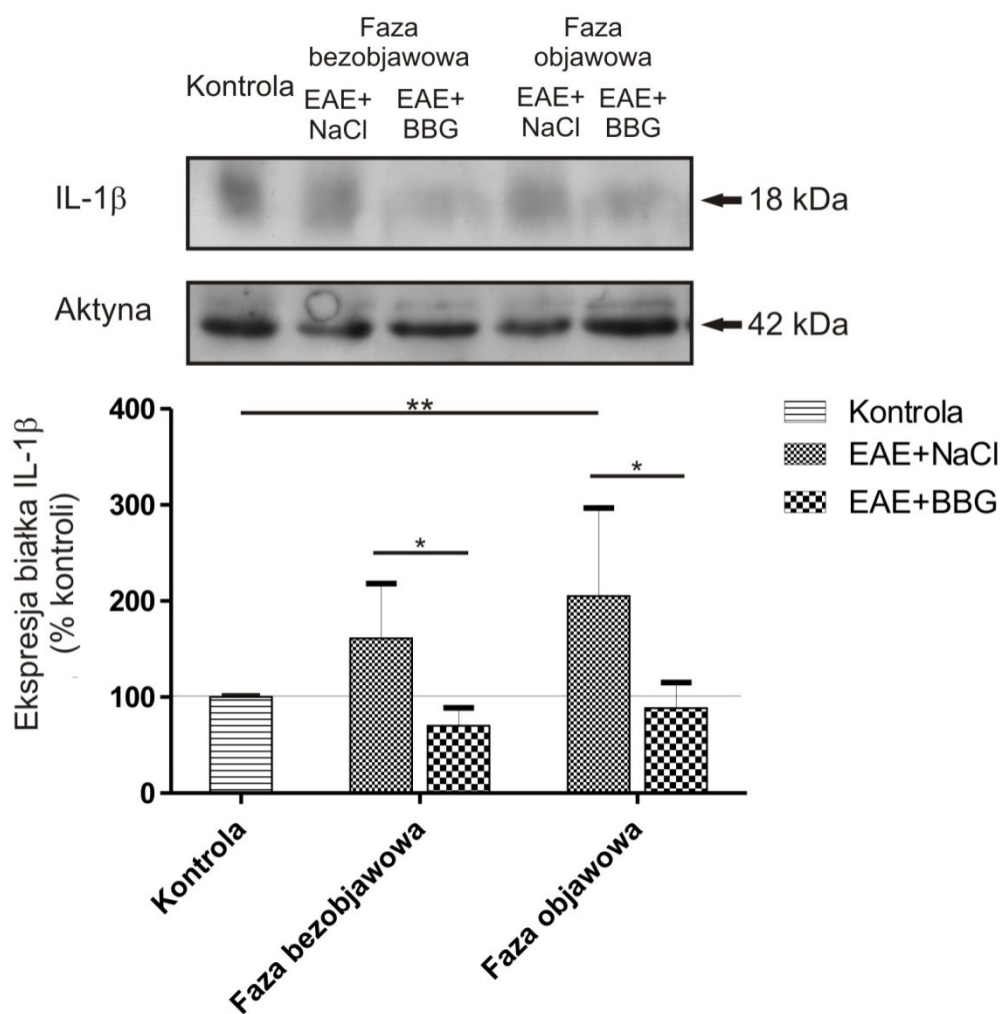
Rycina 47. Poziom średniej fluorescencji Iba1 mierzony w skrawkach mózgow zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, którym podano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 - BBG, w różnych czasach po immunizacji, otrzymanych w barwieniu immunohistochemicznym, a następnie zobrazowanych za pomocą mikroskopu konfokalnego. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SD z pomiarów średniej fluorescencji w obrazach. ***P < 0,001 vs. kontrola bądź vs. EAE+NaCl. Różnice pomiędzy grupami badanymi a kontrolą oceniono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Różnice wewnątrzgrupowe oceniono przy użyciu testu t-Studenta.

4.3.5. Wpływ podania BBG na zmiany profilu cytokin prozapalnych u zwierząt z EAE

W celu określenia wpływu BBG na aktywność receptora P2X7 przeprowadzono porównanie poziomu białka cytokin prozapalnych: IL-1 β ; IL-6; TNF- α w homogenatach mózgow szczurów kontrolnych (nieimmunizowanych), szczurów poddanych EAE, którym podano NaCl oraz poddanych EAE, którym podano BBG.

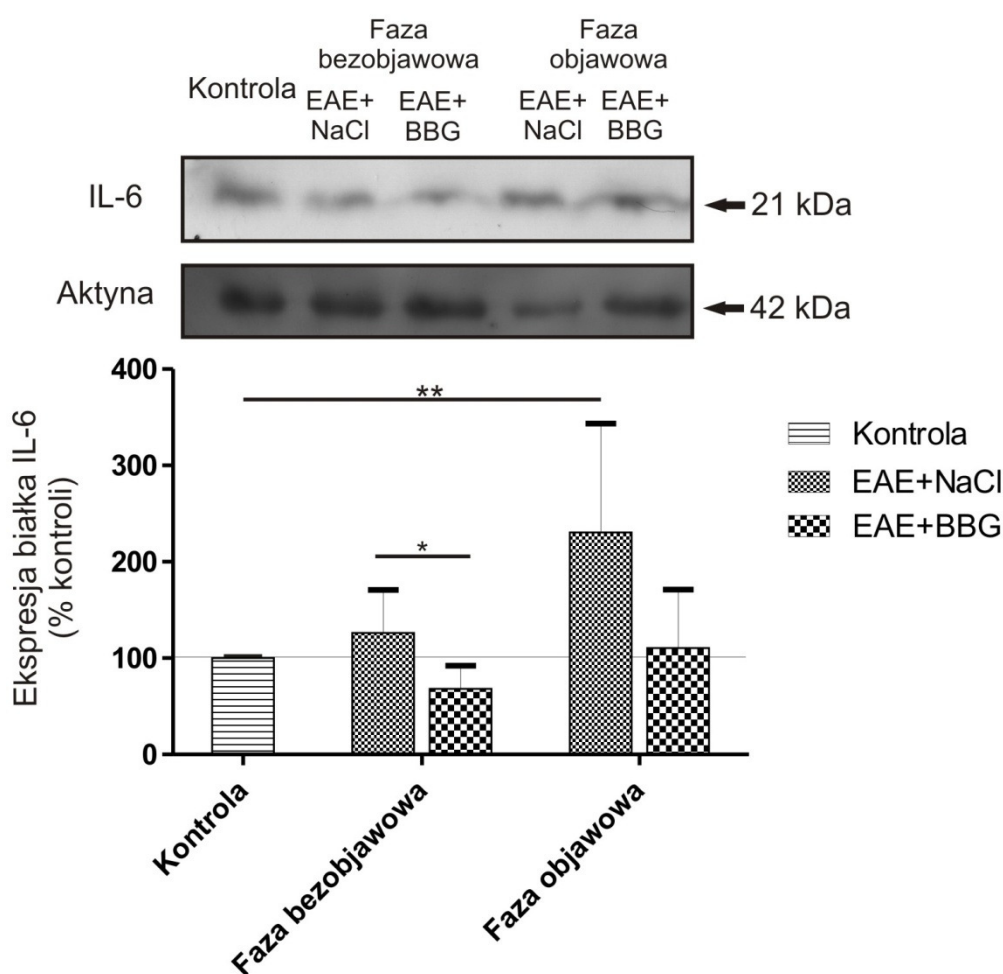
Poziom **interleukiny 1 β** , najważniejszej cytokiny prozapalnej, której ekspresja jest kontrolowana przez receptor P2X7, wzrastał w homogenatach mózgu u szczurów poddanych EAE już w fazie bezobjawowej, osiągając 161% poziomu występującego u szczurów kontrolnych. W fazie objawowej poziom białka IL-1 β osiągnął 205% poziomu kontrolnego, natomiast nie zaobserwowano wzrostu poziomu tej prozapalnej cytokiny u szczurów, którym

podano antagonistę receptora P2X7 (BBG). Zarówno w fazie bezobjawowej jak i objawowej poziom był zbliżony do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych (Ryc.48).



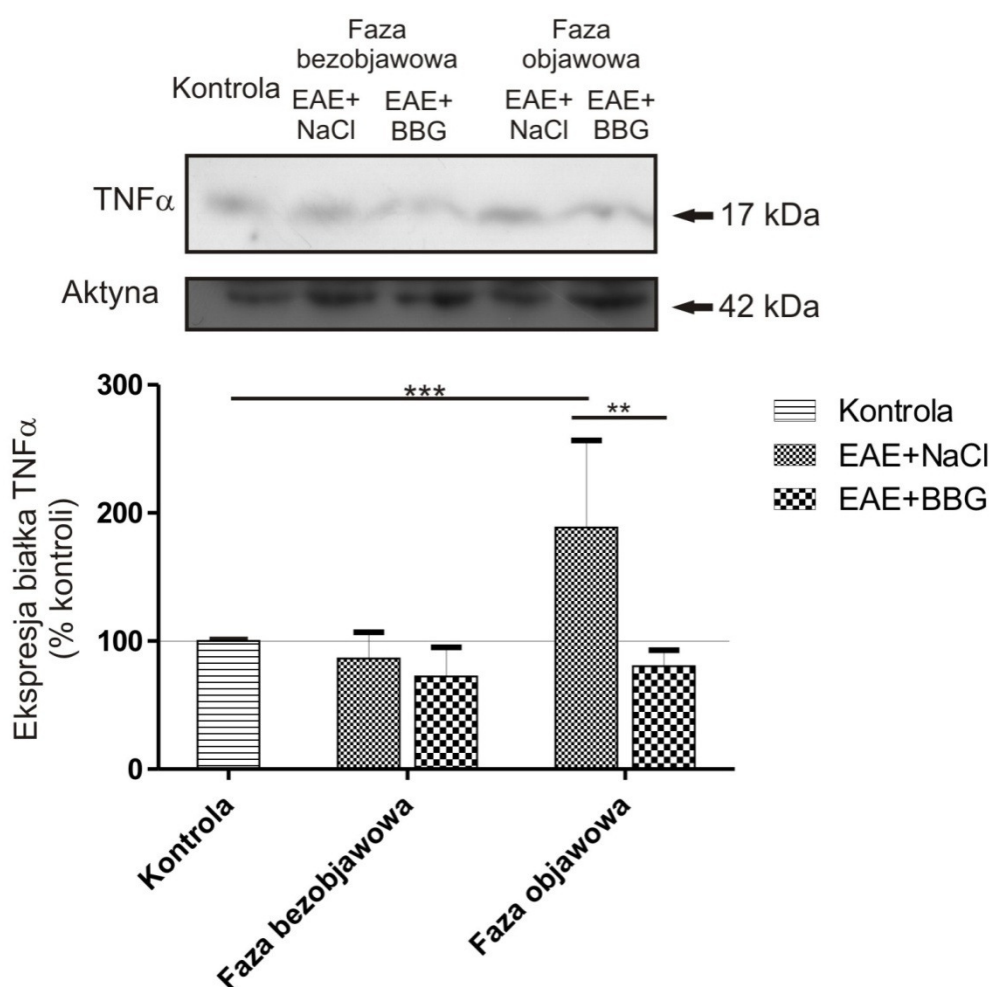
Rycina 48. Względny poziom białka interleukiny 1 β w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, którym podano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 - BBG, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P < 0,01 vs. kontrola; *P < 0,05 vs. EAE+NaCl. Różnice międzygrupowe oceniono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Różnice wewnątrzgrupowe oceniono przy użyciu testu t-Studenta. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli.

Poziom białka **interleukiny 6** w homogenatach mózgow szczerów poddanych EAE, którym podano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę P2X7R kształtował się podobnie jak w przypadku IL-1 β . U szczerów EAE+NaCl poziom tej cytokiny wzrastał w fazie bezobjawowej do poziomu 150%, a w fazie objawowej do poziomu 230% wartości kontrolnych. U szczerów, którym podawano BBG, ekspresja IL-6 pozostawała na poziomie zbliżonym do kontroli (80%). W fazie objawowej natomiast poziom tej cytokiny wzrastał do poziomu 130% wartości kontrolnych, jednakże był nadal niższy niż poziom obserwowany u szczerów, którym nie podano BBG (Ryc. 49).



Rycina 49. Względny poziom interleukiny 6 w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, którym podano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 - BBG, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P < 0,01 vs. kontrola; *P < 0,05 vs. EAE+NaCl. Różnice pomiędzy grupami badanymi a kontrolą oceniono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Różnice wewnątrzgrupowe oceniono przy użyciu testu t-Studenta. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli.

Poziom białka **TNF- α** w fazie bezobjawowej pozostawał na podobnym poziomie u szczurów EAE+NaCl jak i EAE+BBG i był zbliżony do kontroli (odpowiednio 86% oraz 72% kontroli). W fazie objawowej obserwowano wzrost tej cytokiny w grupie zwierząt poddanych EAE+NaCl (189% kontroli), natomiast u zwierząt, którym podano równolegle BBG nie zaobserwowano wzrostu poziomu białka TNF- α (80% kontroli) (Ryc. 50).



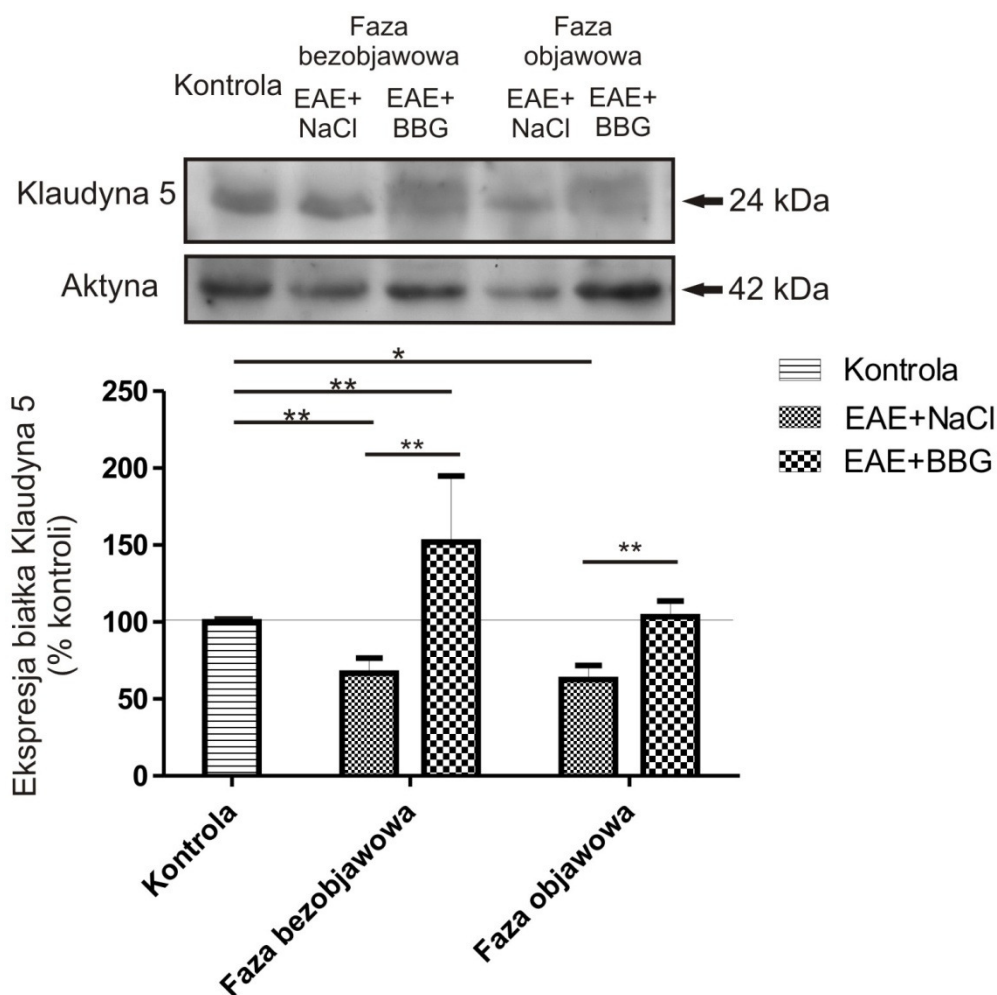
Rycina 50. Względny poziom TNF- α w homogenacie mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, którym podawano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 - BBG, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P <0,01 vs. EAE+NaCl; ***P < 0,001 vs. kontrola. Różnice pomiędzy grupami badanymi a kontrolą oceniono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Różnice wewnątrzgrupowe oceniono przy użyciu testu t-Studenta. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli.

4.3.6. Wpływ podania antagonisty P2X7R na poziom białka kładyna 5

Z danych literaturowych oraz z badań wykonanych w niniejszej pracy wynika, że w trakcie rozwoju EAE następuje rozszczelnienie bariery krew-mózg już we wczesnej fazie choroby. Ocena poziomu charakterystycznego dla bariery krew-mózg białka kładyny 5, którego poziom może odzwierciedlać stopień szczelności połączeń ścisłych pomiędzy komórkami endotelium mikronaczyń mózgu, wykazała jego spadek. Ponadto wykazaliśmy obecność receptora P2X7 w obrębie mikronaczyń mózgu, co sugeruje jego potencjalne zaangażowanie w regulację bariery krew-mózg.

Dlatego zbadano poziom białka kładyny 5 w homogenatach mózgów szczurów poddanych EAE (grupa EAE+NaCl) oraz szczurów, którym po wywołaniu EAE podawano BBG (grupa EAE+BBG). Poziom tego białka spadał we wczesnej, bezobjawowej fazie EAE do 67%, a w fazie objawowej do 63% poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych. Natomiast w grupie EAE+BBG kształtował się on na poziomie 150% wartości kontrolnych w fazie bezobjawowej oraz ok. 100% w fazie objawowej (Ryc. 51). Podanie antagonisty P2X7R skutkowało zahamowaniem spadku poziomu tego białka o odpowiednio 87% i 40% w stosunku do wartości obserwowanych u zwierząt z EAE+NaCl.

Podsumowując część badań dotyczącą zmian przebiegu EAE pod wpływem podania BBG – specyficznego antagonisty receptora P2X7R należy podkreślić, że podanie tego związku opóźnia pojawianie się objawów neurologicznych, zmniejsza ich siłę i poprawia ogólny stan zwierząt, u których wywołano EAE. Zaobserwowano również znaczne zahamowanie aktywacji zarówno astrogleju jak i mikrogleju. Zablokowanie działania P2X7R przez antagonistę powoduje ponadto zmniejszenie wydzielania cytokin prozapalnych takich jak IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α , zwiększając jednocześnie poziom białka markera połączeń ścisłych, co może sugerować zmniejszenie przepuszczalności BBB.



Rycina 51. Względny poziom białka klaudyna 5 w homogenatach mózgu zwierząt kontrolnych i poddanych EAE, którym podano NaCl oraz poddanych EAE, którym podawano antagonistę receptora P2X7 - BBG, w różnych czasach po immunizacji, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie \pm SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. **P < 0,01 vs. kontrola bądź vs. EAE+NaCl; *P < 0,05 vs. kontrola. Różnice pomiędzy grupami badanymi a kontrolą oceniono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Różnice wewnątrzgrupowe oceniono przy użyciu testu t-Studenta. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli.

5. Dyskusja

Pierwsze badania stwardnienia rozsianego zostały przeprowadzone ponad 170 lat temu, ale pomimo rozwoju technik badawczych oraz ciągłego poszerzania stanu wiedzy o patomechanizmach tej choroby, do tej pory nie udało się określić bezpośrednich przyczyn jej rozwoju. Coraz dokładniejsze poznanie mechanizmów przebiegu tego schorzenia pozwala rozwijać nowe terapie, jednak do dnia dzisiejszego, pomimo znacznego postępu, nie udało się znaleźć sposobu na całkowite zatrzymanie choroby. Leki obecnie dostępne spowalniają jedynie jej przebieg, wydłużają okresy pomiędzy rzutami oraz zmniejszają ich siłę. Dlatego też wciąż istnieje potrzeba poszukiwania nowych strategii leczniczych w walce ze stwardnieniem rozsianym.

5.1. Zasadność użycia modelu EAE i jego charakterystyka

Badania nad stwardnieniem rozsianym przeprowadzane są na modelach zwierzęcych, ponieważ obecnie nie ma możliwości odwzorowania w warunkach *in vitro* wszystkich możliwych interakcji jakie zachodzą na styku uznawanych za najbardziej skomplikowane w ludzkim organizmie układów - nerwowego oraz immunologicznego. Jedynie model zwierzęcy jest w stanie przybliżyć procesy przebiegające u chorych z SM.

Model EAE, a w szczególności EAE rozwinięty na gryzoniach, jest stosowany standardowo w badaniach nad stwardnieniem rozsianym. Nowe leki, m.in. takie jak glatiramer czy natalizumab, powstały w wyniku badań na modelu EAE lub/i były następnie testowane w oparciu o ten model (Wekerle i Kurschus 2006).

Niestety model ten nie jest pozbawiony wad i jest często krytykowany. W opinii niektórych naukowców ma on ograniczone zastosowanie w badaniach nad SM, a wyniki uzyskane z jego zastosowaniem mogą być błędne (Wekerle i Kurschus 2006). Dobrym przykładem ograniczeń tego modelu może być próba opracowania terapii opartej o przeciwciała monoklonalne anty-CD28, które pomimo dobrych rezultatów w badaniach na modelu EAE, w czasie prób u ludzi wywoływały systemową odpowiedź układu odpornościowego. Innym przykładem jest natalizumab, którego zastosowanie przynosiło

bardzo dobre rezultaty w badaniach na gryzoniach, natomiast u części chorych przyczyniło się do rozwinięcia PML. Z tego też powodu został on przejściowo wycofany z leczenia. Ostatecznie uznano jednak, że korzyści płynące z jego zastosowania przewyższają ryzyko wystąpienia PML (Wekerle i Kurschus 2006).

Innym zagadnieniem związanym z użytym w niniejszej pracy modelem jest sposób wywołania choroby, który niekoniecznie odwzorowuje ten występujący w SM. W przypadku EAE, chorobę wywołuje podanie antygenów mieliny wraz z adiuwantem. Natomiast etiologia SM jest nieznana, istnieje więc prawdopodobieństwo, że mechanizm jej powstawania może być całkowicie odmienny.

Pomimo powyższych niedoskonałości, nie ma obecnie lepszego modelu tej choroby. Dlatego też, w badaniach w niniejszej pracy zastosowano szczurzy model EAE, ze świadomością ograniczeń jakie się z nim wiążą.

Użyty w badaniach model EAE jest stosowany od wielu lat w Pracowni Patoneurochemii (Mitosek-Szewczyk i wsp. 2008; Grygorowicz i wsp. 2010; Grygorowicz i wsp. 2011; Sulkowski i wsp. 2014). Polega on na immunizacji zwierząt przy użyciu szczepionki, której najważniejszym składnikiem jest homogenat rdzenia kręgowego świnki morskiej. Taki sposób immunizacji wywołuje odpowiedź układu odpornościowego na całą gamę białek mielinowych, w przeciwieństwie do często stosowanych modeli, w których immunogenem jest pojedyncze białko mielinowe (bądź jego fragment) i jest ona dużo silniejsza.

Szczury w zastosowanym w niniejszej pracy modelu rozwijają pierwsze objawy neurologiczne średnio w 10 dniu po immunizacji, podczas gdy szczyt objawów występuje średnio w 13 dniu po immunizacji. Okres od 2 dpi do 8 dpi określiliśmy mianem fazy bezobjawowej, natomiast okres od 10 dpi do ustąpienia objawów jako fazę objawową (Ryc. 12). Przebieg EAE, który uzyskano, jest bardzo zbliżony do tego opisywanego w wielu pozycjach literaturowych (Lutz i wsp. 2013; Bibolini i wsp. 2014; Yamamoto i wsp. 2014; Yin i wsp. 2014; Djikic i wsp. 2015; Lavrnja i wsp. 2015; Petkovic i wsp. 2015), a nawet nie różni się znacznie od tego, w którym użyto szczury inne niż Lewis np. DA (Djikic i wsp. 2015), czy Wistar (Bibolini i wsp. 2014).

Oprócz charakterystycznych objawów neurologicznych, ocena masy ciała badanych zwierząt stanowi dodatkowy parametr mówiący o ich kondycji w trakcie trwania doświadczenia. Zmiany masy ciała zwierząt wynikają nie tylko z wyniszczenia organizmu w wyniku rozległego stanu zapalnego, ale również ze zmniejszenia łaknienia oraz, w późniejszych czasach, z deficytów neurologicznych, które mogą utrudniać przyjmowanie pokarmu. W doświadczeniach masa ciała zwierząt poddanych EAE spadała dwuetapowo. W pierwszym etapie pomiędzy 1 dpi a 5 dpi obserwowano spadek masy ciała zwierząt o 2,8%, będący prawdopodobnie skutkiem toczących się procesów zapalnych w miejscu podania szczepionki. Następny istotny statystycznie spadek masy ciała zwierząt w stosunku do wagi z dnia 0 (o 16 %) obserwowano pomiędzy 10 dpi a 17 dpi. Następnie masa zwierząt rosła, osiągając na koniec doświadczenia poziom 95% masy z dnia 0 (Ryc. 13). Początek występowania objawów neurologicznych pokrywał się z istotnym statystycznie spadkiem masy ciała zwierząt, co wskazuje na rozwój intensywnego procesu chorobowego. Szczyt objawów neurologicznych (średnio 13 dpi) występuje wcześniej niż najniższa obserwowana u zwierząt masa ciała, co może być skutkiem ciągłego trwania procesów chorobowych, w tym utrzymywania się wysokiego poziomu cytokin prozapalnych takich jak np. IL-1 β czy TNF- α .

Barwienia histologiczne wykazały obecność zmian patologicznych w OUN charakterystycznych dla tego modelu. Zmiany te były zlokalizowane zarówno w obrębie rdzenia kręgowego jak i w mózgu. Zaobserwowano nacieki zapalne w oponie miękkiej mózgu, w jądrach podstawy mózgu oraz w rdzeniu kręgowym, zarówno w fazie bezobjawowej jak i objawowej EAE (Ryc. 14). Wykazano również obecność zgęszczenia istoty białej w obrębie zarówno mózgu, jak i rdzenia kręgowego już w fazie bezobjawowej EAE (Ryc. 15).

Istnieje powszechny pogląd, że objawy neurologiczne zwierząt z EAE korelują z patologią rdzenia kręgowego. Badania na szczurzym modelu EAE wskazują, że naczynia przestrzeni podpajęczynówkowej dolnych części rdzenia kręgowego są początkową drogą napływu limfocytów, co może sugerować że EAE jest w pierwszym rzędzie chorobą rdzenia kręgowego (Bartholomaeus i wsp. 2009). Jednak zarówno obecne wyniki, jak i prace wielu innych grup badawczych wskazują, że nie tylko uszkodzenia rdzenia kręgowego ale również mózgu, mają udział w patologii EAE (Ayers i wsp. 2004; Wang i wsp. 2005; Mitosek-Szewczyk i wsp. 2008). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują także na to, że w mózgu procesy

prowadzące do uszkodzenia mieliny rozpoczynają się na długo przed pojawianiem się pierwszych objawów neurologicznych, tj. w fazie bezobjawowej EAE, nawet 2 dni po immunizacji. Natomiast w badaniach grupy Schmitt i wsp. (2012) obserwowano napływ komórek układu odpornościowego, poprzez płyn mózgowo-rdzeniowy do komórek mózgu, dopiero 9 dni po immunizacji. W okresie bezobjawowym (2-6 dpi) nie wykazywano znaczących różnic w infiltracji komórek układu odpornościowego w obrębie komórek (Schmitt i wsp. 2012). Niniejsze wyniki są natomiast spójne z badaniami z użyciem mysiego modelu EAE, które wykazały że pierwszym celem dla limfocytów jest istota biała okołokomorowa oraz sąsiadująca z oponami mózgu (Brown i Sawchenko 2007). Potwierdza to, że patologia EAE dotyczy w równym stopniu mózgu i rdzenia kręgowego. Badania histopatologiczne wykonane w celu charakterystyki modelu w niniejszej pracy, wykazały wczesne występowanie zmian patologicznych w mózgu zwierząt immunizowanych w postaci uszkodzenia bariery krew-mózg, co wyrażało się wynacynieniem albuminy (4 dpi) oraz obecnością okołonaczyniowych nacieków zapalnych (2 i 6 dpi). W rdzeniu kręgowym tego typu zmiany zanotowano dopiero w fazie objawowej choroby. Dlatego też w dalszej części pracy badania skupiono na zmianach zachodzących w mózgu.

5.2. Ekspresja i aktywność P2X7R w mózgu zwierząt w przebiegu EAE

Istnieją dwa poglądy tłumaczące indukcję stanu zapalnego na skutek odpowiedzi autoimmunologicznej w SM. Pierwszy opiera się na stwierdzeniu, że pierwotnie powstają zmiany w OUN i to one w konsekwencji powodują napływ komórek układu odpornościowego. Według alternatywnego poglądu, komórki odpornościowe napływają do OUN jako skutek odpowiedzi immunologicznej zapoczątkowanej na obwodzie. Receptor P2X7, ze względu na zaangażowanie w wydzielanie cytokin prozapalnych, może być jednym z ważnych elementów biorących udział w indukcji procesu zapalnego w trakcie rozwoju EAE/SM, niezależnie od sposobu jego zapoczątkowania.

Dotychczasowe badania wykazały zaangażowanie receptorów purynergicznych P2X7 w rozwój szeregu patologii OUN, w których występuje komponent zapalny (Sperlagh i Illes 2014). Wykazano, że nadekspresja P2X7R na oligodendrocytach prowadzi do śmierci tych komórek *in vitro* i *in vivo*, a traktowanie zwierząt z EAE antagonistą P2X7R zmniejsza

nasilenie objawów EAE (Matute i wsp. 2007). Nie badano natomiast ekspresji tego receptora na innych komórkach, choć wiadomo że występuje on dość powszechnie w OUN.

Aby odpowiedzieć na pytanie postawione w celu badawczym przeprowadzono analizę profilu czasowego zmian ekspresji P2X7R w mózгах szczurów kontrolnych oraz poddanych EAE. Badania RT-PCR oraz Western blot dostarczyły dowodów na to, że w czasie rozwoju EAE ekspresja receptora ulega zmianom. Poziom mRNA P2X7R zmieniał się dwuetapowo. W pierwszym etapie, obejmującym fazę bezobjawową, poziom mRNA wykazywał tendencję wzrostową, a w drugim etapie (faza objawowa) ekspresja mRNA rosła statystycznie istotnie (Ryc. 16). Natomiast istotne zmiany w poziomie białka P2X7R następowały już w fazie bezobjawowej (Ryc. 17). W fazie tej zaobserwowano korelację czasową pomiędzy istotnym statystycznie wzrostem poziomu białka, a tendencją wzrostową poziomu mRNA dla receptora P2X7. Może to świadczyć o zaangażowaniu w regulację poziomu białka P2X7R również innych mechanizmów oprócz tych działających na poziomie transkrypcji. Wczesny wzrost poziomu białka receptora P2X7 sugeruje potencjalny udział tego receptora w procesach związanych z zapoczątkowaniem stanu patologicznego w obrębie OUN. Wzrost ten częściowo może być reakcją komórek OUN na rozwijający się w miejscu podania szczepionki intensywny stan zapalny.

Wzrost poziomu białka receptora obserwowany w fazie objawowej korelował ze wzrostem poziomu mRNA. Zmiany ekspresji receptora na tym etapie choroby mogą wskazywać na związek z powstawaniem zmian patologicznych skutkujących deficytami neurologicznymi, ponieważ wzrost poziomu P2X7R koreluje z wystąpieniem objawów neurologicznych. Analogiczny wzrost ekspresji P2X7R obserwowano w przebiegu niedokrwienia u szczurów (Franke i wsp. 2004), jak również w rozwoju pooperacyjnego bólu chronicznego (Ying i wsp. 2014) oraz przy uszkodzeniu nerwu kulszowego (Song i wsp. 2015).

Do identyfikacji „komórkowego źródła” zmian ekspresji P2X7R wykorzystano izolowane frakcje komórkowe oraz barwienia immunohistochemiczne skrawków mózgowych.

Wbrew oczekiwaniom nie zaobserwowano zmian poziomu białka tego receptora w izolowanej frakcji mielinowej w żadnym z badanych punktów czasowych choroby (Ryc. 18). Wynik ten może sugerować brak bezpośredniego zaangażowania receptora w zmiany

patologiczne w obrębie mieliny, co stoi w sprzeczności z wynikami badań Matute i współpracowników na tkankach autopsyjnych chorych na SM (Matute i wsp. 2007), które wykazały wzrost ekspresji P2X7R, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, w osłonce mielinowej nerwu wzrokowego. Wynik ten może sugerować odmienny mechanizm powstawania zmian patologicznych w obrębie mieliny u chorych na SM oraz zwierząt z EAE. Przyczyną mogą być różnice gatunkowe, jak również fakt pobrania tkanek *post mortem* od pacjentów z długoletnim SM, co w nieunikniony sposób może generować zmiany w ekspresji różnych białek.

Neuronalna ekspresja receptora P2X7 została zbadana na frakcji synaptosomalnej. Frakcja ta uznana została za reprezentację ekspresji P2X7R w neuronach, ponieważ wcześniej wykazano obecność receptora na zakończeniach nerwowych (Marcoli i wsp. 2008), gdzie może on mieć wpływ na neurotransmisję poprzez udział w uwalnianiu glutaminianu oraz GABA w synapsach (Sperlagh i wsp. 2002; Duan i Neary 2006; Marcoli i wsp. 2008).

We frakcji synaptosomalnej w fazie bezobjawowej EAE obserwowano istotne statystycznie obniżenie poziomu białka P2X7R względem zwierząt kontrolnych (Ryc. 19). Jednocześnie występuje wzmożona ekspresja paneksyny 1, która jest wyrazem aktywacji receptora P2X7 (Ryc. 34) (Pelegri i Surprenant 2006; Li i wsp. 2011). Może to sugerować obecność mechanizmu kompensującego w stosunku do cytotoksycznego działania receptora na neurony we wczesnej fazie EAE. Dopiero po załamaniu się tego mechanizmu pojawiają się pierwsze symptomy chorobowe. Potwierdzenie istnienia proponowanego mechanizmu wymaga dalszych badań. Istotnie jednak, poziom białka P2X7R w tej frakcji wzrastał w fazie objawowej (o 20% względem kontroli) (Ryc. 19), a barwienie immunohistochemiczne potwierdziło obecność receptora P2X7 na komórkach nerwowych, jak również wykazało wzrost immunofluorescencji w fazie objawowej (Ryc. 20). Wzrost ekspresji P2X7R na neuronach koreluje czasowo z nasileniem objawów u zwierząt poddanych EAE oraz z wysokim poziomem cytokin prozapalnych. Możliwe więc, że receptor ten jest zaangażowany w rozwój objawów EAE również poprzez uszkodzenie neuronów. Pomimo, że SM/EAE uważa się przede wszystkim za patologię istoty białej, opisano współistniejące uszkodzenia neuronów i aksonów w istocie szarej (Pirko i wsp. 2007).

Aby sprawdzić potencjalny udział astrocytów w mózgowej ekspresji receptora P2X7 przeprowadzono izolację frakcji gliosomów (GPV), posiadającej charakterystykę białkową i aktywność komórek astrocytarnych (Strużyńska 2000). Badanie Western blot tej frakcji wykazało wczesny wzrost poziomu białka P2X7R w fazie bezobjawowej EAE i późniejszy spadek w fazie objawowej (Ryc. 21), a barwienie immunohistochemiczne potwierdziło obecność i wzmożoną immunoreaktywność receptora P2X7R na astrocytach (Ryc. 22).

Wyniki te sugerują, że źródłem zmian poziomu P2X7R, obserwowanych w homogenatach mózgow szczerów we wczesnej fazie rozwoju EAE, jest pula astrocytów. To natomiast sugeruje potencjalnie ważną rolę astrocytów i astrocytarnego receptora P2X7R w początkowych procesach prowadzących do rozwoju objawów. Podczas gdy za zmianę poziomu P2X7R w fazie objawowej odpowiedzialna jest pula komórek nerwowych, astrocytarna pula P2X7R może być odpowiedzialna za zapoczątkowanie i rozwój objawów neurologicznych. Wczesną nadekspresję P2X7R w puli astrocytarnej obserwowano również w patologiach takich jak: niedokrwienie (Franke i wsp. 2004) czy uszkodzenie rdzenia kręgowego (Wang i wsp. 2004).

Wiadomo, że astrocyty biorą udział w kontroli poziomu glutaminianu poprzez zespół transporterów dla tego neuroprzekaźnika, chroniąc neurony przed ekscytotoksycznością (Matute i wsp. 2007). Postuluje się jednak również istnienie mechanizmu uwalniania glutaminianu z astrocytów, w który zaangażowany jest P2X7R (Duan i wsp. 2003). Ponadto aktywacja astrocytarnego P2X7R może prowadzić do uwalniania ATP (Suadicani i wsp. 2006). Zarówno ATP jak i glutaminian wykazują potencjał cytotoksyczny (Pitt i wsp. 2000; Burnstock 2015). Neurotoksyczny wpływ nadmiaru glutaminianu był obserwowany u pacjentów z SM (Stover i wsp. 1997). Włączenie komponentu glutaminianergicznego w patomechanizm tej choroby zostało również wykazane na modelu EAE (Sulkowski i wsp. 2013; Sulkowski i wsp. 2014). Niniejsze wyniki sugerują możliwość udziału astrocytarnego P2X7R w początkowych fazach choroby, poprzez uwalnianie substancji cytotoksycznych takich jak ATP i glutaminian.

Potwierdzeniem wczesnego zaangażowania astrocytów w rozwój EAE jest ich aktywacja. Obecność reaktywnych astrocytów obserwowano już w fazie bezobjawowej (4 dpi), a procesy aktywacji i namnażania komórek miały miejsce również w fazie objawowej, (Ryc. 24). Morfologiczne wykładniki aktywacji korelowały ze wzrostem poziomu białek GFAP i

S100 β uznanymi za markery aktywacji (Ryc. 25 A, B). Jednocześnie aktywacja astrocytów występowała równoległe ze wzrostem ekspresji P2X7R na astrocytach.

Stan reaktywny wiąże się ze zwiększeniem wrażliwości astrocytów na ATP oraz zwiększoną gotowością do produkcji i wydzielania cytokin, w tym cytokin prozapalnych. Astrocytarna pula P2X7R może być zaangażowana w proces wydzielania cytokin prozapalnych np. IL-1 β (John i wsp. 2001). Tak więc, krótko po immunizacji (4 dpi) astrocyty mogą partycypować w rozwoju stanu zapalnego w obrębie OUN poprzez aktywowane receptorem P2X7 wydzielanie cytokin prozapalnych. Wczesna aktywacja astrocytów może być zależna od wzrostu poziomu ekspresji oraz aktywności receptora P2X7 prowadzącej do zwiększenia wydzielania IL-1 β . Obserwowana korelacja czasowa pomiędzy aktywacją astrocytów, wzrostem ekspresji P2X7R oraz wzrostem poziomu IL-1 β , może być uzależniona od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Jak wiadomo, aktywacja P2X7R prowadzi do aktywacji tego czynnika transkrypcyjnego, który jest niezbędny również w procesie pobudzenia astrocytów (Brambilla i wsp. 2009). Doświadczenia tej grupy wskazują na ważną rolę aktywacji NF- κ B w rozwoju objawów w EAE.

Koneksyna o masie cząsteczkowej 43 kDa (Cx-43) jest głównym białkiem połączeń szczelinowych (ang. gap junctions) pomiędzy astrocytami. Poziom tego białka w fazie bezobjawowej (4 dpi) wzrastał równoległe ze wzrostem markerów aktywacji astrocytów. Następnie obserwowaliśmy podwyższoną ekspresję tego białka w fazie objawowej EAE (10 dpi) (Ryc. 25 C). Wiadomo, że w stanach patologicznych koneksyny mogą bezpośrednio wpływać na aktywność synaptyczną neuronów (Pannasch i wsp. 2011) oraz na przeżycie neuronów (Froger i wsp. 2010). Obecność stanu zapalnego w mózgu może prowadzić do miejscowych nieprawidłowości w połączeniach ścisłych oraz zwiększenia ilości hemikanałów (Karpuk i wsp. 2011). Stan zapalny wywołany LPS-em powoduje wzrost aktywności (otwarcie) hemikanałów zbudowanych z Cx43 na astrocytach i jest to zależne od aktywacji mikrogleju oraz obecności cytokin prozapalnych (Abudara i wsp. 2015). Białko to w wyniku nadekspresji może tworzyć niesparowane hemikanały, będąc podobnie jak P2X7R, źródłem uwalniania potencjalnie neurotoksycznych substancji takich jak glutaminian czy ATP (Kang i wsp. 2008; Mika i Prochnow 2012). Tak więc, obserwowany w bezobjawowej fazie EAE wzrost ekspresji Cx43 oraz P2X7R, może przemawiać za istnieniem takiego mechanizmu uwalniania substancji neurotoksycznych z astrocytów. Dodatkowo we wczesnym EAE

obserwujemy warunki sprzyjające patologicznemu działaniu białka Cx43 tj. wysoki poziom cytokin prozapalnych, aktywację astrocytów oraz komórek mikroglejowych.

W trakcie obserwacji zmian astrocytów w przebiegu EAE stwierdzono obecność komórek o cechach klazmatodendrozy (Ryc. 23 D, E). Klazmatodendroza jest stanem patologicznym powstałym w odpowiedzi na załamanie się energetycznej wydolności komórki, ze współistniejącą kwasicą oraz zahamowaniem funkcji mitochondriów. Zmiany patologiczne astrocytów tego typu zostały wcześniej wykazane w chorobie Alzheimera, niedokrwienia i w modelu padaczki (Kim i wsp. 2011). W dostępnej literaturze istnieje jedno doniesienie o klazmatodendrozie w autopsyjnych tkankach chorych na SM (Rafałowska i wsp. 1992). Natomiast nie było dotychczas wzmianki o występowaniu tego typu patologii w modelu EAE. Praca zespołu Ryu i współpracownicy (2011) wykazała, że wakuole astrocytów z klazmatodendrozą są pochodzenia lizosomowego oraz wykazują obecność markera LC3-II charakterystycznego dla autofagosomów. Wskazuje to na powiązanie klazmatodendrozy astrocytów ze śmiercią komórki na drodze autofagii (Ryu i wsp. 2011). Wiadomo, że fosforylacja NF- κ B aktywuje klazmatodendrozę (Ryu i wsp. 2011), jak również, że pobudzenie receptora P2X7R aktywuje NF- κ B (Ferrari i wsp. 1997; Skaper i wsp. 2010). Sugeruje, to że zahamowanie aktywności P2X7R powinno wpłynąć protekcyjnie na występowanie patologii astrocytów typu klazmatodendrozy. Jednak z badań Kim (2011) wynika, że hamowanie P2X7R z użyciem specyficznego antagonisty BBG powoduje zwiększenie ilości astrocytów ulegających tej patologii (Kim i wsp. 2011). Te przeciwstawne dane można wyjaśnić poprzez odmienny mechanizmy aktywacji NF- κ B. W klazmatodendrozie obserwowano aktywację NF- κ B poprzez fosforylacje podjednostki p65 na serynie 529 (Ryu i wsp. 2011), natomiast aktywacja receptora P2X7R powoduje fosforylację NF- κ B na serynie 276 i 311 podjednostki p65 (Kim i wsp. 2013), co może powodować tworzenie się odmiennych aktywnych dimerów a tym samym odmienny efekt aktywacji.

W niniejszej pracy wykazano również zgrubienie wypustek astrocytów okołonaczyniowych (Ryc. 23 F, G, H). Wiadomo że astrocyty, jako składnik złącza nerwowo-naczyniowego, wpływają na stan bariery krew mózg. W patologii SM/EAE limfocyty T przenikają do OUN przez komórki endotelium, a następnie pokonują stopki astrocytarne. Pobudzone astrocyty wykazują ekspresję białek adhezyjnych dla komórek układu odpornościowego np.: VCAM-1 - ligand dla α 4-integrzyn (Gimenez i wsp. 2004). Oprócz

wzrostu ekspresji białek przylegania komórkowego, aktywne astrocyty przynaczyniowe mogą, dzięki podwyższonej ekspresji receptora P2X7, wydzielać cytokiny prozapalne, które z kolei mogą wpływać na rozszczelnienie BBB. Tak więc, aktywacja astrocytów okołonaczyniowych może ułatwiać migrację komórek układu odpornościowego do OUN poprzez barierę krew-mózg.

Obecność P2X7R na mikrogleju była już wielokrotnie wykazywana (Parvathenani i wsp. 2003; Yiangou i wsp. 2006; Takenouchi i wsp. 2007; Kobayashi i wsp. 2011). Badania lokalizacji receptora P2X7 w niniejszej pracy potwierdziły jego obecność na komórkach mikroglejowych. Mikroglej charakteryzował się wczesnym wzrostem immunoreaktywności dla białka Iba1 oraz zmianami morfologicznymi wskazującymi na jego aktywację (Ryc. 26). Aktywacja mikrogleju następowała równolegle z aktywacją komórek astrogleju. W trakcie rozwoju EAE, w fazie bezobjawowej, immunoreaktywność P2X7R rosła równolegle ze wzrostem poziomu białka Iba1. Ekspresja receptora P2X7R na komórkach mikrogleju wiąże się z jego udziałem w wydzielaniu przez te komórki cytokin prozapalnych (Ferrari i wsp. 1997), a tym samym w indukcji stanu zapalnego. Do tej pory mikroglej był uważany za pulę komórkową, która w pierwszej kolejności reaguje na czynniki stresowe poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych. Cytokiny oddziałują zarówno na komórki układu odpornościowego na obwodzie, co powoduje ich migrację i gromadzenie w OUN, jak również na komórki astroglejowe co skutkuje ich aktywacją. Jak wiadomo, astrocyty również mają zdolność wydzielania cytokin prozapalnych, co implikuje możliwość wzajemnej aktywacji obydwu puli komórkowych, a tym samym możliwość kooperatywnego generowania stanu zapalnego w OUN.

W przebiegu niniejszej pracy eksperymentalnej zbadano również lokalizację receptora P2X7 w obrębie mikronaczyń mózgu. W literaturze brak do tej pory doniesień o obecności tego receptora w mikronaczyniach mózgu szczura, z wyjątkiem mikronaczyń siatkówki (Kawamura i wsp. 2003). Za pomocą barwień immunohistochemicznych wykazano obecność tego receptora w mikronaczyniach mózgu szczura na naczyniach izolowanych (Ryc. 27; 28; 31) jak również na naczyniach bezpośrednio w tkance (Ryc. 29). Analiza morfologiczna za pomocą podwójnych barwień immunohistochemicznych z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał anti-P2X7R, w połączeniu z przeciwciałami anti-GFAP lub anti-klaudyna 5 wykazała, obecność P2X7R-pozytywnych komórek po zewnętrznej

stronie naczyń, oraz po wewnętrznej stronie GFAP-pozytywnych stopek astrocytarnych. Wynik ten sugeruje, że komórki P2X7R-pozytywne to pericyty. Potwierdzeniem tego jest kolokalizacja białka P2X7R z antygenem pericytów – białkiem PDGFR β (Ryc. 28).

Pericyty są komórkami o charakterze regulatorowym, komunikującymi się z innymi komórkami tworzącymi jednostkę nerwowo-naczyniową poprzez fizyczny kontakt, auto i parakrynnie, a z komórkami endotelialnymi (EC) także poprzez połączenia ścisłe. Kontakt pomiędzy komórkami endotelialnymi i pericytami jest niezbędny do powstania połączenia ścisłego. W trakcie powstawania połączeń ścisłych w mikronaczyń, pericyty indukują syntezę okludyn i kładyn w EC. Kontakt EC z astrocytami wzmacnia jedynie ekspresję ZO-1 (Gardner i wsp. 1997). Pericyty regulują średnicę mikronaczyń, a ATP jest jednym z czynników zwężających mikronaczynia siatkówki (Bonkowski i wsp. 2011). Na podstawie obecności P2X7R na pericytach mikronaczyń mózgowych można zatem spekulować, że ATP również odgrywa regulacyjną rolę w tych komórkach. Pericytarny P2X7R może być jednym z receptorów odpowiedzialnych za komunikację z astrocytami, będącymi źródłem zewnątrzkomórkowego ATP.

Ponieważ pericyty są komórkami zaangażowanymi w regulację funkcji bariery krew-mózg, określono czy w trakcie rozwoju EAE następują zmiany w ekspresji białka P2X7R. Badanie Western blot na frakcji naczyniowej wykazało wzrost poziomu białka receptora w fazie bezobjawowej EAE, utrzymujący się aż do fazy objawowej włącznie, z wyjątkiem 6 dpi, gdzie obserwowano powrót ekspresji do poziomu kontrolnego. Podwyższony poziom P2X7R w pericytach może sugerować nieprawidłowe funkcjonowanie pericytów prowadzące do zwiększenia przepuszczalności BBB, poprzez zwiększenie transcytozy w komórkach endotelialnych (Armulik i wsp. 2010). Interesującym spostrzeżeniem był spadek poziomu P2X7R we frakcji naczyniowej w 6 dpi. Pierwszym możliwym sposobem wyjaśnienia tej obserwacji może być uruchomienie komórkowych mechanizmów regulujących ekspresję tego białka. Ponieważ jednak jedynym rodzajem komórek w obrębie mikronaczyń wykazującym obecność P2X7R są pericyty, zmniejszenie ich liczby może być odpowiedzialne za obserwowany spadek poziomu białka P2X7R. Spadek liczby pericytów może następować w wyniku śmierci tych komórek na skutek pobudzenia P2X7R (jego ekspresja jest zwiększona w poprzedzającym okresie), bądź też ich migracji z obrębu naczynia do otaczających tkanek (Dore-Duffy i wsp. 2000). Przypuszcza się, że utrata pericytów może pełnić ważną rolę w

patologii takich chorób jak np. udar, nowotwory mózgu, retinopatia cukrzycowa jak również stwardnienie rozsiane (Bonkowski i wsp. 2011), prowadząc do miejscowej utraty szczelności BBB (Dore-Duffy i LaManna 2007). Odpowiedź na pytanie czy w powyższym przypadku dochodzi do zmniejszenia liczby pericytów czy też spadku poziomu białka P2X7R wymaga dalszych badań.

Badania stanu BBB wykazały, że rozszczelnienie następuje już w fazie bezobjawowej EAE (4 dpi), kiedy obserwujemy nacieki zapalne wokół naczyń. Również barwienie na pozanaczyniową albuminę wykazało jej obecność w przestrzeni międzykomórkowej. Albumina może wydostawać się ze światła naczynia także na drodze wzmożonej transcytozy. Jednakże w stanie fizjologicznym komórki endotelialne mikronaczyń mózgu mają niewiele pęcherzyków pinocytarnych (Sa-Pereira i wsp. 2012), stąd zwiększony jej wpływ sugeruje nieprawidłowe funkcjonowanie bariery. Badania białka kładyna 5, jednej ze składowych kompleksu budującego połączenie ścisłe pomiędzy komórkami endotelium, wykazały spadek jego poziomu we frakcji naczyniowej już w fazie bezobjawowej EAE. Biorąc pod uwagę fakt, że kładyny stanowią główne białka połączeń ścisłych (Nitta i wsp. 2003), wynik ten sugeruje zaburzenie ich działania, a tym samym upośledzenie funkcji BBB.

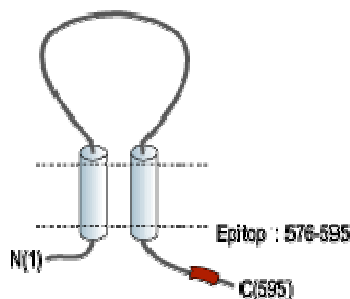
Z drugiej jednak strony, istnieją pewne wątpliwości co do przydatności kładyny 5 jako markera stanu BBB w EAE. Obserwowano bowiem obniżenie ekspresji kładyny 3, a nie kładyny 5 w trakcie rozwoju EAE (Wolburg i wsp. 2003). W naszych badaniach natomiast obserwujemy korelację czasową pomiędzy spadkiem poziomu białka kładyna 5 (Ryc. 32), a wzrostem przepuszczalności naczyń objawiającym się wynaczynieniem albuminy (Ryc. 33).

Warto podkreślić również korelację czasową pomiędzy wzrostem ekspresji receptora P2X7R w pericytach, a spadkiem ekspresji białka kładyna 5 w komórkach endotelialnych, co może sugerować zaburzenie mechanizmów regulacyjnych pericyt-komórka endotelialna, które też mogą skutkować rozszczelnieniem BBB.

Należy jednak mieć na uwadze, że udział drogi naczyniowej, jako jedynej drogi napływu komórek odpornościowych do mózgu chorych z SM, jest dyskusyjny. Dane literaturowe wskazują, że infiltracja mózgu przez leukocyty następuje także poprzez drogi związane z płynem mózgowo-rdzeniowym (Giunti i wsp. 2003), co częściowo potwierdza też

lokalizacja uszkodzeń mieliny (Kutzelnigg i wsp. 2005). Podobna sytuacja może występować w EAE (Brown i Sawchenko 2007).

Istotnym problemem w ocenie wyników badań wykonywanych przy użyciu przeciwciał anti-P2X7R jest ich specyficzność. Przeciwciała anti-P2X7R wykorzystane w niniejszej pracy zostały zakupione w firmie Alomone Labs (numer katalogowy APR-004). Przeciwciało jest specyficzne dla fragmentu C końcowego białka P2X7R. Epitopem jest peptyd „(C)KIRKEFPKTQGQYSGFKYPY” znajdujący się w białku na pozycji od 576 do 595 aa (Ryc. 52). P2X7R posiada jednakże wiele wariantów splicingowych. U gryzoni występują dwie pełne izoformy posiadające 13 eksonów i różniące się miejscem startu transkrypcji – P2X7RA (595aa) (Cheewatrakoolpong i wsp. 2005) oraz P2X7RK (592aa) (Nicke i wsp. 2009). Izoformy P2X7RG oraz P2X7RH posiadają alternatywny ekson N3 zawierający nowy kodon start, a tym samym nie posiadają domeny transbłonowej TM1. Izoformy P2X7RD, P2X7RE, P2X7RF nie zawierają natomiast eksonów 5, 7, 8 lub 7 i 8. Według danych producenta wszystkie te izoformy receptora powinny być wykrywane przez użyte w doświadczeniach przeciwciało. Istnieją jednak takie izoformy, które nie posiadają fragmentu białka przeciwko któremu zostały wytworzone przeciwciała np.: izoformy P2X7RB, P2X7RC, P2X7RG i P2X7RE, które mają skrócony koniec C (Cheewatrakoolpong i wsp. 2005) oraz izoforma P2X7RJ pozbawiona wewnątrzkomórkowego końca C, domeny transbłonowej TM2 oraz fragmentu pętli zewnątrz komórkowej (Feng i wsp. 2006).



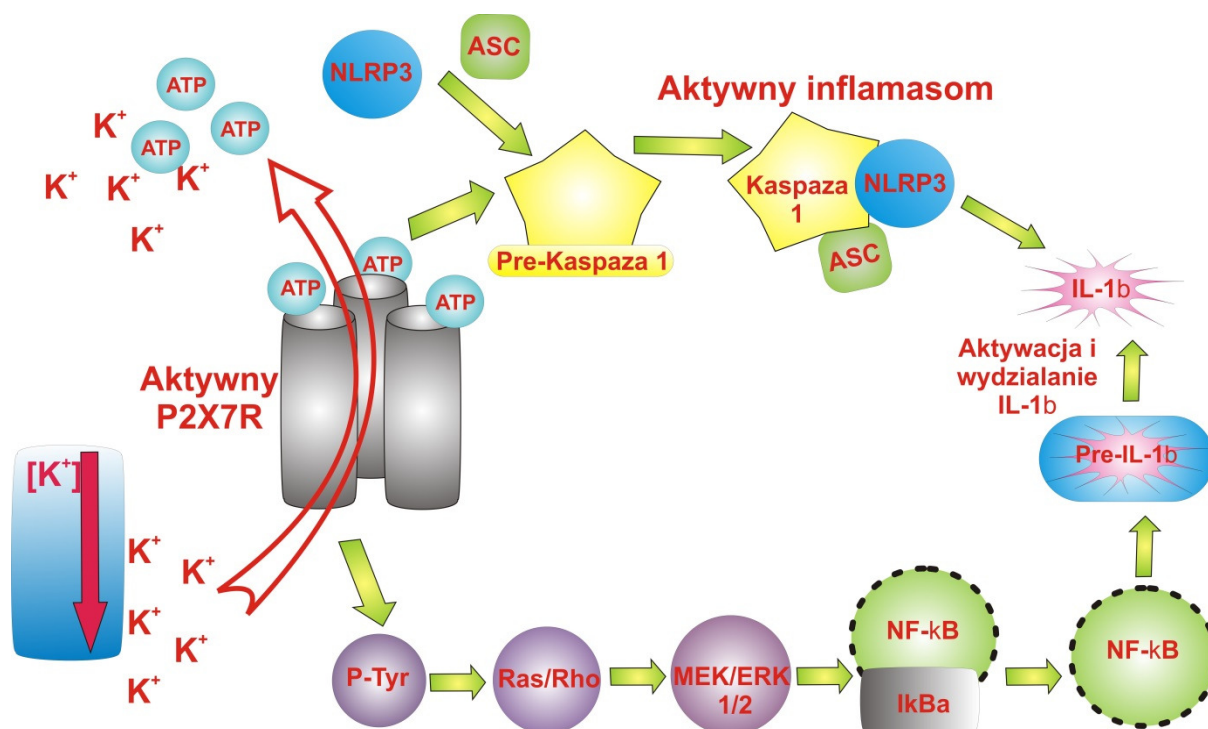
Rycina 52. Lokalizacja epitopu dla przeciwciał anti P2X7R (za http://www.alomone.com/p/anti-p2x7_receptor_/apr-004/98).

Istnieją dane potwierdzające, że różne formy transkrypcyjne P2X7R mają odmienne właściwości. Izoforma P2X7RB w układzie nadekspresji ma właściwości pobudzające proliferację, natomiast dodatkowa ekspresja izoformy P2X7RA wykazuje wzmożony efekt

pobudzający (Adinolfi i wsp. 2010). Są również badania wskazujące, że funkcjonowanie P2X7R może być regulowane poprzez ekspresję różnych wariantów splicingowych P2X7R (Kido i wsp. 2014). Należy zatem mieć na uwadze, że otrzymane wyniki z użyciem przeciwciał anty-P2X7R mogą nie odzwierciedlać w pełni sytuacji zachodzącej w mózgu w przebiegu EAE.

Rola P2X7R w mózgu nie jest jeszcze w pełni poznana. Wiadomo, że P2X7R związany jest z procesem zapalnym, ale istnieją również doniesienia o ochronnej funkcji tego receptora np. poprzez uwalnianie endogennych kanabinoidów, 2-AG (Witting i wsp. 2006), czy też plazminogenu (Inoue i wsp. 1998). Myszy nokauty P2X7R $-/-$ wykazywały silniejsze objawy EAE niż myszy dzikie (Chen i Brosnan 2006), co sugeruje, że P2X7R może pełnić zarówno pozytywną jak i negatywną rolę w patologii EAE/SM. Bez wątplenia najlepiej udowodnioną dotychczas funkcją patologiczną receptora P2X7 jest udział w wydzielaniu cytokin prozapalnych. Jednym z głównych efektów aktywacji tego receptora jest dojrzewanie i wydzielanie interleukiny 1β (Kahlenberg i Dubyak 2004; Mariathasan i wsp. 2006). Dlatego też uważa się, że poziom tej cytokiny może odzwierciedlać aktywność receptora. Wiadomo również, że działający poprzez P2X7R ATP jest najbardziej efektywnym stymulatorem dojrzewania IL- 1β (Ferrari i wsp. 2006).

W niniejszej pracy istotny statystycznie wzrost aktywnej formy **IL- 1β** zaobserwowano dopiero w szczycie objawów (Ryc. 36), jednakże w trakcie badanego przedziału czasowego EAE, wzrastał poziom formy nieaktywnej tej cytokiny - **pre-IL- 1β** (Ryc. 35). Wiadomo, że receptor P2X7, oprócz wpływania na dojrzewanie i wydzielanie IL- 1β , może również aktywować syntezę pre-IL- 1β . Działanie to zachodzi poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który zwiększa transkrypcję pre-IL- 1β (Ryc. 53) (Ferrari i wsp. 1997; Skaper i wsp. 2010).



Rycina 53. Schemat obrazujący wpływ receptora P2X7 na dojrzewanie IL-1 β i na wzrost ekspresji jej formy prekursorowej pre-IL-1 β (wg: Skaper i wsp. 2010).

IL-6 oraz TNF- α są cytokinami prozapalnymi, które uczestniczą w reakcji zapalnej. W badanym modelu EAE również zaobserwowano wzrost poziomu białka tych cytokin. Już 4 dpi zanotowano tendencję wzrostową, a w fazie objawowej znaczący i statystycznie istotny wzrost poziomu tych białek. Bezpośredni wpływ aktywacji P2X7R na wydzielanie interleukiny 6 jest gorzej udokumentowany, niż to ma miejsce w przypadku IL-1 β (Solini i wsp. 1999). Jednakże poziom cytokin IL-6 i TNF- α może wzrastać również wtórnie, na skutek aktywacji przez IL-1 β (Cieslak i wsp. 2011).

Wzrost stężenia cytokin prozapalnych w tkance niesie za sobą rozległe konsekwencje. Między innymi wiadomo, że cytokiny te mają działanie pirogenne (Horai i wsp. 1998), aktywują komórki T oraz B (Kindt 2006), wzmagając działanie układu odpornościowego. Cytokiny prozapalne zwiększają również ekspresję białek przylegania komórkowego, ułatwiając tym samym rekrutację komórek układu odpornościowego (Bartholomaeus i wsp. 2009). IL-1 β oraz TNF- α zwiększają napływ komórek układu odpornościowego do tkanki zarówno poprzez zwiększenie przepuszczalności naczyń, jak też zwiększenie ekspresji białek przylegania komórkowego takich jak ICAM i VCAM (Cayrol i wsp. 2008).

Kolejną udowodnioną patologiczną funkcją aktywnego P2X7R jest wywoływanie śmierci komórkowej (Di Virgilio i wsp. 1998). Za właściwości cytolityczne receptora jest najprawdopodobniej odpowiedzialna paneksyna 1 – białko wchodzące w skład aktywnego kompleksu P2X7R. Wyniki niniejszej pracy wykazały wzrost Panx1 w fazie bezobjawowej EAE powracający do poziomu kontroli w fazie objawowej choroby w neuronach. Obserwacja ta mogłaby sugerować uruchomienie neurotoksycznych właściwości kompleksu P2X7R. Istnieją bowiem dane łączące wzrost ekspresji tego białka ze wzmożoną śmiercią komórek (Locovei i wsp. 2007). Jednakże wzrost ekspresji Panx1 nie pokrywa się ze zmianami ekspresji białka P2X7R, którego poziom w neuronach wzrasta dopiero w fazie objawowej.

5.3. Wpływ antagonisty P2X7R na przebieg EAE oraz na wybrane procesy patologiczne

Spośród komercyjnie dostępnych antagonistów P2X7R wybrano BBG, kierując się brakiem toksyczności tego związku oraz łatwością przekraczania BBB (Peng i wsp. 2009), w przeciwieństwie do alternatywnego oxy-ATP.

Jako sposób podania związku wybrano podanie przez cewnik dożylny. Wstępne badania wykazały bowiem, że wielokrotne podawanie dootrzewnowe, ze względu na objętość iniekcji oraz ryzyko uszkodzenia jelit, może powodować wystąpienie u badanych zwierząt stanu zapalnego otrzewnej. Stan zapalny w otrzewnej natomiast, wprowadza dodatkową zmienną do choroby autoimmunizacyjnej o charakterze zapalnym jaką jest EAE. Ponadto, nie jest znana dynamika wchłaniania BBG z otrzewnej do krwioobiegu zwierząt. Wszystkie te czynniki zdecydowały o wybraniu ww. sposobu podania antagonisty.

Dawka dobową BBG została dobrana na podstawie dostępnej literatury (Ryu i wsp. 2011; Ridderstrom i Ohlsson 2014; Del Puerto i wsp. 2015) oraz wstępnych badań własnych. Wybór schematu czasowego podań antagonisty był podyktowany planem zablokowania aktywności receptora równoległe z immunizacją zwierzęcia, ze względu na zakładany udział tego receptora we wczesnym etapie rozwoju EAE.

Wybrana dawka oraz sposób podania antagonisty zwierzętom immunizowanym spowodowały opóźnienie pojawiania się objawów neurologicznych oraz osłabienie ich

nasilenia. Co więcej, skutkowały także mniejszym spadkiem masy ciała, co wskazuje na lepszy stan ogólny zwierząt.

Podobny wzór zmian w występowaniu objawów u zwierząt z EAE obserwowwała grupa Lutz i współpracownicy (2013). Opóźnienie pojawienia się deficytów neurologicznych oraz spadek ich nasilenia występował u myszy pozbawionych funkcjonalnego genu *panx1*, jak również przy podawaniu meflokininy (ang. Mefloquine, MFQ), specyficznego inhibitora paneksyny 1 (Lutz i wsp. 2013). W zestawieniu z naszymi wynikami mogą one wspierać tezę o funkcjonalnej zależności P2X7R i Panx1.

Zaobserwowana poprawa ogólnego stanu zwierząt może być wieloprzyczynowa. Może ona m.in. wynikać z protekcyjnego wpływu antagonistów receptora P2X7 na komórki nerwowe, a szczególnie ich aksony. Wykazano bowiem, że podanie BBG chroni aksony przed uszkodzeniami w modelu niedokrwienia u szczura (Del Puerto i wsp. 2015).

Lepszy stan zdrowia zwierząt może również wiązać się z szybszą regeneracją aksonów. Wykazano bowiem, że antagoniści P2X7R wzmagają wzrost aksonów (Diaz-Hernandez i wsp. 2008; del Puerto i wsp. 2012)

Należy mieć również na uwadze, że receptory purynergiczne zostały odnalezione w niszach komórek macierzystych (Shukla i wsp. 2005), gdzie odgrywają rolę w fizjologii tych komórek, regulując ich podziały, różnicowanie oraz śmierć (Ulrich i wsp. 2012). Wykazano ponadto, że aktywacja receptorów purynergicznych zwiększa proliferację progenitorów neuralnych w obecności czynników wzrostowych *in vitro* (Mishra i wsp. 2006; Grimm i wsp. 2010). W obliczu tych informacji, podanie BBG może mieć negatywny wpływ na procesy regeneracyjne, jednakże faza cofania się objawów EAE oraz późniejsze okresy życia zwierząt nie były przez nas badane.

Prawdopodobnie jednak, główną przyczyną poprawy ogólnego stanu zwierząt było osłabienie reakcji zapalnej.

Na wczesnym etapie rozwoju EAE, w mózgu zwierząt immunizowanych dochodzi do aktywacji komórek gleju, zarówno astrogleju jak i mikrogleju. Wykazaliśmy, że podanie BBG powoduje znaczące zahamowanie tego procesu. Aktywacja astrocytów mierzona poziomem białka oraz poziomem immunofluorescencji GFAP zmniejszała się u zwierząt z EAE, którym podano antagonistę w stosunku do zwierząt z EAE nie traktowanych BBG. Podobny hamujący efekt miał miejsce w przypadku mikrogleju, którego aktywacja mierzona była poziomem

immunofluorescencji Iba1. Wyniki te świadczą niezbicie o istotnej roli receptora P2X7 w indukcji reaktywnej gliozy w początkowym etapie rozwoju EAE.

Badania innych grup wykazały, że blokada receptorów purynergicznycch w modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego redukuje gliozę i zmniejsza tworzenie blizny astrocytarnej (Rodriguez-Zayas i wsp. 2012). W doświadczeniach tych użyto niespecyficznycch antagonistów receptorów z rodziny P2, a więc także antagonistów receptora P2X7. Podobną zależność pomiędzy aktywacją gleju oraz działaniem receptora P2X7R zaobserwowała grupa Peng i współpracownicy (2009), którzy po podaniu BBG wykazali spadek aktywacji komórek glejowych, redukcję stanu zapalnego i mniejsze uszkodzenia tkanki w modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego (Peng i wsp. 2009).

Wyniki te są częściowo sprzeczne z pracą grupy Franke i wsp. (2001), która sugeruje udział w aktywacji komórek glejowych głównie receptorów purynergicznycch z grupy P2Y takich jak P2Y1 i P2Y11, a mniejszy udział receptorów z grupy P2X. Niemniej, we wspomnianej pracy nie badano bezpośrednio receptora P2X7 (Franke i wsp. 2001).

Jednakże w przypadku modelu EAE nie jesteśmy w stanie wykluczyć, że hamowanie aktywacji komórek gleju przez BBG zachodzi wtórnie do hamowania aktywności P2X7R znajdującego się na komórkach układu odpornościowego. Ponieważ receptor P2X7 występuje dość powszechnie w układzie odpornościowym (Bours i wsp. 2011), możliwe jest, że w początkowej fazie antagonisty hamuje wydzielanie cytokin przez te komórki w mechanizmie zależnym od P2X7R, przez co w efekcie hamuje aktywację gleju.

Co więcej, nie można również wykluczyć, że pozytywne działanie antagonisty P2X7R na przebieg EAE opiera się na hamowaniu procesów zapalnych na obwodzie, a tym samym spowolnieniu i osłabieniu procesów zapalnych prowadzących do rozwoju zmian w OUN.

Istotnie, podanie antagonisty P2X7R spowodowało zahamowanie wzrostu poziomu cytokin prozapalnych, głównie aktywnej formy IL-1 β , ale również IL-6 we wczesnej fazie EAE. Taka tendencja spadkowa utrzymywała w trakcie całego badanego okresu tj. również w fazie objawowej. W fazie objawowej podanie BBG zahamowało wzrost poziomu cytokiny TNF- α . Mając na uwadze doniesienia, że ATP stymuluje dojrzewanie IL-1 β przez P2X7R-zależny mechanizm (Ferrari i wsp. 2006), można stwierdzić na podstawie otrzymanycch wyników, że mechanizm ten ma miejsce na wczesnym etapie rozwoju EAE. Ponieważ IL-1 β znajduje się na

szczyście kaskady zapalnej, brak innych czynników zapalnych (indukowanych przez IL-1 β) takich jak IL-6, TNF- α , tlenek azotu, COX-2, iNOS, IL-2 i IFN- γ (Arulkumaran i wsp. 2011; Cieslak i wsp. 2011) może również przyczynić się do hamowania rozwoju stanu zapalnego.

W trakcie rozwoju EAE dochodzi do infiltracji OUN przez komórki układu odpornościowego poprzez rozszczelnioną barierę krew-mózg. Komórki układu odpornościowego, przechodząc przez BBB wydzielają cytokiny prozapalne, które wpływają na dalsze rozszczelnianie BBB (Alvarez i wsp. 2011). Dodatkowo IL-1 β pośrednio destabilizuje BBB poprzez zwiększenie ekspresji metaloproteinazy-9 (MMP-9) (Sozen i wsp. 2009), która to zaangażowana jest w proteolizę białek połączeń ścisłych, takich jak: okludyny, ZO-1, kładyna-5 i innych (Bauer i wsp. 2010; Alvarez i wsp. 2011).

Wyniki opisane w rozdziale 4.2.1.5. zasugerowały potencjalny udział receptora P2X7 w patologii BBB w trakcie rozwoju EAE. Obniżenie poziomu białka kładyna 5 wskazuje na prawdopodobne rozszczelnienie bariery na skutek rozwijającego się stanu zapalnego w obrębie OUN. W grupie zwierząt, którym podano BBG, poziom białka kładyna 5 w fazie bezobjawowej wzrósł do poziomu 150% w stosunku do zwierząt kontrolnych oraz pozostał na poziomie kontroli w fazie objawowej (Ryc. 51). Wskazuje to na protekcyjną rolę antagonisty receptora P2X7 w utrzymaniu szczelności bariery krew-mózg. Ochronne działanie BBG na BBB może zachodzić bezpośrednio poprzez zlokalizowany na pericytach receptor P2X7 (4.2.1.5), bądź pośrednio, poprzez blokowanie wydzielania cytokiny prozapalnej IL-1 β przez komórki układu odpornościowego na obwodzie (Sozen i wsp. 2009). Wzrost poziomu białka powyżej poziomu kontroli (150%) w fazie bezobjawowej EAE w grupie BBG sugeruje obecność mechanizmu kompensującego utratę szczelności BBB.

5.4. Perspektywy użycia antagonistów P2X7R w leczeniu

Dotychczasowa wiedza wskazuje jednak, że blokowanie działania receptora P2X7R powinno prowadzić do zahamowania formowania się inflamasomu (NALP3) a przez to do zahamowania produkcji aktywnej formy cytokiny IL-1 β . Zaangażowanie receptora P2X7 w procesy związane ze stanem zapalnym sprawia, że od dłuższego czasu rozważa się jego wykorzystanie jako potencjalnego celu w terapiach wielu chorób takich jak nowotwory, choroby płuc i choroby zapalne stawów. Zakłada się również, że zastosowanie antagonistów P2X7R powinno dać pozytywny efekt m.in. w chorobach autoimmunizacyjnych (Bours i wsp.

2011). O potencjale związków blokujących działanie receptora P2X7 może świadczyć fakt, że ich zastosowanie w terapii stwardnienia rozsianego zostało opatentowane (Boes 2012). Niemniej jednak brak jest dotychczas wyników badań klinicznych.

Natomiast badania kliniczne 2 fazy nad potencjalnym wykorzystaniem antagonisty P2X7R w reumatoidalnym zapaleniu stawów wykazały że związek AZD9056 nie ma wpływu na przebieg tej choroby (Keystone i wsp. 2012). Dotychczasowe dane eksperymentalne, jak również wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie, wskazują że związki blokujące działanie receptora P2X7 mogą mieć potencjalnie zastosowanie w leczeniu chorób z komponentem zapalnym. Jednakże do tej pory nie wprowadzono do praktyki klinicznej żadnego związku działającego na receptor P2X7, ani też ogólniej, na receptory z grupy P2X (Alves i wsp. 2013).

6. Podsumowanie wyników

- Poziom białka receptora P2X7 rośnie w fazie bezobjawowej oraz w fazie objawowej EAE. Wzrost w fazie bezobjawowej związany jest z pulą astrocytarną, a wzrost w fazie objawowej z pulą neuronalną. Nie zaobserwowano zmian w poziomach białka P2X7R we frakcji mielinowej.
- Receptor P2X7 występuje w mikronaczyniach mózgowych na komórkach pericytarnych, jego ekspresja jest podwyższona w przebiegu EAE (z wyjątkiem 6 dpi) i koreluje czasowo ze spadkiem ekspresji kładyny 5 – głównego białka połączeń ścisłych.
- W trakcie rozwoju EAE następuje wczesna (4 dpi) aktywacja komórek glejowych, zarówno astrocytów jak i mikrogleju oraz wzrost poziomu białka aktywnych i prekursorowych form cytokin prozapalnych takich jak IL-1 β , IL-6 i TNF- α .
- Zwierzęta poddane EAE, którym podano BBG, rozwijają objawy później oraz z mniejszym nasileniem niż zwierzęta kontrolne i wykazują lepszy ogólny stan zdrowia.
- Podanie BBG nie wpływa na ekspresję receptora P2X7, powoduje natomiast zahamowanie aktywacji komórek astroglejowych i mikroglejowych.
- Zablokowanie aktywności receptora P2X7R hamuje wzrost poziomu cytokin prozapalnych po wywołaniu EAE oraz spadek poziomu kładyny 5, białka połączeń ścisłych i markera stanu BBB.

7. Wnioski

1. Obserwowany w fazie bezobjawowej EAE wzrost ekspresji białka receptora P2X7R na komórkach gleju i pericytach mikronaczyń mózgowych, skorelowany ze wzrostem jego aktywności (wyrażonej zwiększeniem poziomu cytokin prozapalnych), sugeruje zaangażowanie tego receptora we wczesne etapy choroby.
2. Występująca w przebiegu EAE wczesna aktywacja gleju związana z indukcją stanu zapalnego jest procesem, przynajmniej częściowo, zależnym od receptora P2X7.
3. Protekcyjne działanie antagonisty receptora P2X7 wobec klaudyny 5 – białka połączeń ścisłych i markera przepuszczalności BBB – sugeruje udział tego receptora w mechanizmach związanych ze zwiększeniem przepuszczalności BBB we wczesnych etapach EAE.
4. Zahamowanie aktywności receptora P2X7 poprzez zastosowanie specyficznego antagonisty poprawia stan zwierząt, osłabia i opóźnia objawy choroby, ale nie hamuje całkowicie ich wystąpienia, co świadczy o tym, że mechanizmy uruchamiane przez ten receptor stanowią jedynie część złożonego patomechanizmu choroby.

8. Literatura

1. Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof i D. J. Begley (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." *Neurobiol Dis* **37**(1): 13-25.
2. Abudara, V., L. Roux, G. Dallerac, I. Matias, J. Dulong, J. P. Mothet, N. Rouach i C. Giaume (2015). "Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes." *Glia* **63**(5): 795-811.
3. Adinolfi, E., M. Cirillo, R. Woltersdorf, S. Falzoni, P. Chiozzi, P. Pellegatti, M. G. Callegari, D. Sandona, F. Markwardt, G. Schmalzing i F. Di Virgilio (2010). "Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor." *FASEB J* **24**(9): 3393-3404.
4. Adriouch, S., C. Dox, V. Welge, M. Seman, F. Koch-Nolte i F. Haag (2002). "Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor." *Journal of immunology* **169**(8): 4108-4112.
5. Aharoni, R., A. Meshorer, M. Sela i R. Arnon (2002). "Oral treatment of mice with copolymer 1 (glatiramer acetate) results in the accumulation of specific Th2 cells in the central nervous system." *J Neuroimmunol* **126**(1-2): 58-68.
6. Akassoglou, K., J. Bauer, G. Kassiotis, M. Pasparakis, H. Lassmann, G. Kollias i L. Probert (1998). "Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy." *Am J Pathol* **153**(3): 801-813.
7. Alvarez, J. I., R. Cayrol i A. Prat (2011). "Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis." *Biochim Biophys Acta* **1812**(2): 252-264.
8. Alves, L. A., R. J. Bezerra, R. X. Faria, L. G. Ferreira i V. da Silva Frutuoso (2013). "Physiological roles and potential therapeutic applications of the P2X7 receptor in inflammation and pain." *Molecules* **18**(9): 10953-10972.
9. Alzola, E., A. Perez-Etxebarria, E. Kabre, D. J. Fogarty, M. Metioui, N. Chaib, J. M. Macarulla, C. Matute, J. P. Dehaye i A. Marino (1998). "Activation by P2X7 agonists of two phospholipases A2 (PLA2) in ductal cells of rat submandibular gland. Coupling of the calcium-independent PLA2 with kallikrein secretion." *J Biol Chem* **273**(46): 30208-30217.
10. Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M. H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B. R. Johansson i C. Betsholtz (2010). "Pericytes regulate the blood-brain barrier." *Nature* **468**(7323): 557-561.
11. Arulkumaran, N., R. J. Unwin i F. W. Tam (2011). "A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases." *Expert Opin Investig Drugs* **20**(7): 897-915.
12. Ascherio, A. i K. L. Munger (2007). "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection." *Ann Neurol* **61**(4): 288-299.
13. Ayers, M. M., L. J. Hazelwood, D. V. Catmull, D. Wang, Q. McKormack, C. C. Bernard i J. M. Orian (2004). "Early glial responses in murine models of multiple sclerosis." *Neurochemistry international* **45**(2-3): 409-419.
14. Baricordi, O. R., L. Melchiorri, E. Adinolfi, S. Falzoni, P. Chiozzi, G. Buell i F. Di Virgilio (1999). "Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor." *J Biol Chem* **274**(47): 33206-33208.
15. Bartholomaeus, I., N. Kawakami, F. Odoardi, C. Schlager, D. Miljkovic, J. W. Ellwart, W. E. Klinkert, C. Flugel-Koch, T. B. Issekutz, H. Wekerle i A. Flugel (2009). "Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions." *Nature* **462**(7269): 94-98.

16. Bauer, A. T., H. F. Burgers, T. Rabie i H. H. Marti (2010). "Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement." J Cereb Blood Flow Metab **30**(4): 837-848.
17. Beigi, R. D., S. B. Kertesz, G. Aquilina i G. R. Dubyak (2003). "Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms." Br J Pharmacol **140**(3): 507-519.
18. Berer, K. i G. Krishnamoorthy (2014). "Microbial view of central nervous system autoimmunity." FEBS Lett.
19. Bettelli, E., D. Baeten, A. Jager, R. A. Sobel i V. K. Kuchroo (2006). "Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice." The Journal of clinical investigation **116**(9): 2393-2402.
20. Bettelli, E. i V. K. Kuchroo (2005). "IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together." The Journal of experimental medicine **201**(2): 169-171.
21. Bibolini, M. J., M. J. Scerbo, G. A. Roth i C. G. Monferran (2014). "Treatment with a hybrid between the synapsin ABC domains and the B subunit of E. coli heat-labile toxin reduces frequency of proinflammatory cells and cytokines in the central nervous system of rats with EAE." Neuroscience **277**: 217-228.
22. Boes, M. C. (2012). P2X7R antagonists and their use, Google Patents.
23. Bonkowski, D., V. Katyshev, R. D. Balabanov, A. Borisov i P. Dore-Duffy (2011). "The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival." Fluids Barriers CNS **8**(1): 8.
24. Booth, R. F. i J. B. Clark (1978). "A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain." Biochem J **176**(2): 365-370.
25. Bours, M. J., P. C. Dagnelie, A. L. Giuliani, A. Wesselius i F. Di Virgilio (2011). "P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation." Frontiers in bioscience **3**: 1443-1456.
26. Brambilla, R., T. Persaud, X. Hu, S. Karmally, V. I. Shestopalov, G. Dvorianchikova, D. Ivanov, L. Nathanson, S. R. Barnum i J. R. Bethea (2009). "Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation." J Immunol **182**(5): 2628-2640.
27. Bravo, D., C. J. Maturana, T. Pelissier, A. Hernandez i L. Constandil (2015). "Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain." Pharmacol Res.
28. Brown, A. M. i B. R. Ransom (2007). "Astrocyte glycogen and brain energy metabolism." Glia **55**(12): 1263-1271.
29. Brown, D. A. i P. E. Sawchenko (2007). "Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Comp Neurol **502**(2): 236-260.
30. Bruzzone, R., S. G. Hormuzdi, M. T. Barbe, A. Herb i H. Monyer (2003). "Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(23): 13644-13649.
31. Burnstock, G. (2015). "An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration." Neuropharmacology.
32. Caillier, S. J., F. Briggs, B. A. Cree, S. E. Baranzini, M. Fernandez-Vina, P. P. Ramsay, O. Khan, W. Royal, 3rd, S. L. Hauser, L. F. Barcellos i J. R. Oksenberg (2008). "Uncoupling the roles of HLA-DRB1 and HLA-DRB5 genes in multiple sclerosis." Journal of immunology **181**(8): 5473-5480.
33. Calderon, T. M., E. A. Eugenin, L. Lopez, S. S. Kumar, J. Hesselgesser, C. S. Raine i J. W. Berman (2006). "A role for CXCL12 (SDF-1alpha) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein." Journal of neuroimmunology **177**(1-2): 27-39.

34. Carman, C. V. i T. A. Springer (2004). "A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them." The Journal of cell biology **167**(2): 377-388.
35. Carmo, M. R., A. P. Menezes, A. C. Nunes, A. Pliassova, A. P. Rolo, C. M. Palmeira, R. A. Cunha, P. M. Canas i G. M. Andrade (2014). "The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis." Neuropharmacology **81**: 142-152.
36. Cayrol, R., K. Wosik, J. L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A. S. Haqqani, K. Kreyborg, S. Krug, R. Moumdjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic i A. Prat (2008). "Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system." Nat Immunol **9**(2): 137-145.
37. Chastain, E. M., D. S. Duncan, J. M. Rodgers i S. D. Miller (2011). "The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 265-274.
38. Cheewatrakoolpong, B., H. Gilchrest, J. C. Anthes i S. Greenfeder (2005). "Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel." Biochem Biophys Res Commun **332**(1): 17-27.
39. Chen, L. i C. F. Brosnan (2006). "Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes." Journal of immunology **176**(5): 3115-3126.
40. Chessell, I. P., J. P. Hatcher, C. Bountra, A. D. Michel, J. P. Hughes, P. Green, J. Egerton, M. Murfin, J. Richardson, W. L. Peck, C. B. Grahames, M. A. Casula, Y. Yiangou, R. Birch, P. Anand i G. N. Buell (2005). "Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain." Pain **114**(3): 386-396.
41. Chomczynski, P. i N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
42. Cieslak, M., F. Kukulski i M. Komoszynski (2011). "Emerging role of extracellular nucleotides and adenosine in multiple sclerosis." Purinergic Signal **7**(4): 393-402.
43. Clyne, J. D., L. F. Wang i R. I. Hume (2002). "Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **22**(10): 3873-3880.
44. Compston, A. i A. Coles (2002). "Multiple sclerosis." Lancet **359**(9313): 1221-1231.
45. Cotrina, M. L., J. H. Lin, A. Alves-Rodrigues, S. Liu, J. Li, H. Azmi-Ghadimi, J. Kang, C. C. Naus i M. Nedergaard (1998). "Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15735-15740.
46. Craighead, M. W., K. M. Middlehurst, R. LeFeuvre, I. Kimber i N. J. Rothwell (2001). "Oxidised adenosine 5'-triphosphate, a P2X(7) antagonist, is toxic to rat cerebellar granule neurones in vitro." Neurosci Lett **311**(2): 77-80.
47. D'Hondt, C., R. Ponsaerts, H. De Smedt, G. Bultynck i B. Himpens (2009). "Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions?" BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **31**(9): 953-974.
48. Daniels, K. K. i T. W. Vickroy (1998). "Simultaneous isolation of glial and neuronal fractions from rat brain homogenates: comparison of high-affinity L-glutamate transport properties." Neurochem Res **23**(1): 103-113.
49. del Puerto, A., J. I. Diaz-Hernandez, M. Tapia, R. Gomez-Villafuertes, M. J. Benitez, J. Zhang, M. T. Miras-Portugal, F. Wandosell, M. Diaz-Hernandez i J. J. Garrido (2012). "Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation." Journal of cell science **125**(Pt 1): 176-188.
50. Del Puerto, A., L. Fronzaroli-Molinieres, M. J. Perez-Alvarez, P. Giraud, E. Carlier, F. Wandosell, D. Debanne i J. J. Garrido (2015). "ATP-P2X7 Receptor Modulates Axon Initial Segment Composition and Function in Physiological Conditions and Brain Injury." Cereb Cortex **25**(8): 2282-2294.

51. Denlinger, L. C., P. L. Fiset, J. A. Sommer, J. J. Watters, U. Prabhu, G. R. Dubyak, R. A. Proctor i P. J. Bertics (2001). "Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide." Journal of immunology **167**(4): 1871-1876.
52. Di Virgilio, F., P. Chiozzi, S. Falzoni, D. Ferrari, J. M. Sanz, V. Venketaraman i O. R. Baricordi (1998). "Cytolytic P2X purinoceptors." Cell Death Differ **5**(3): 191-199.
53. Diaz-Hernandez, M., A. del Puerto, J. I. Diaz-Hernandez, M. Diez-Zaera, J. J. Lucas, J. J. Garrido i M. T. Miras-Portugal (2008). "Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons." Journal of cell science **121**(Pt 22): 3717-3728.
54. Diaz-Hernandez, M., M. Diez-Zaera, J. Sanchez-Nogueiro, R. Gomez-Villafuertes, J. M. Canals, J. Alberch, M. T. Miras-Portugal i J. J. Lucas (2009). "Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration." FASEB J **23**(6): 1893-1906.
55. Didier, N., I. A. Romero, C. Creminon, A. Wijkhuisen, J. Grassi i A. Mabondzo (2003). "Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability." Journal of neurochemistry **86**(1): 246-254.
56. Djikic, J., M. Nacka-Aleksic, I. Pilipovic, D. Kosec, N. Arsenovic-Ranin, Z. Stojic-Vukanic, M. Dimitrijevic i G. Leposavic (2015). "Age-related changes in spleen of Dark Agouti rats immunized for experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **278**: 123-135.
57. Dore-Duffy, P. i J. C. LaManna (2007). "Physiologic angiodynamics in the brain." Antioxid Redox Signal **9**(9): 1363-1371.
58. Dore-Duffy, P., C. Owen, R. Balabanov, S. Murphy, T. Beaumont i J. A. Rafols (2000). "Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury." Microvasc Res **60**(1): 55-69.
59. Duan, S., C. M. Anderson, E. C. Keung, Y. Chen i R. A. Swanson (2003). "P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **23**(4): 1320-1328.
60. Duan, S. i J. T. Neary (2006). "P2X(7) receptors: properties and relevance to CNS function." Glia **54**(7): 738-746.
61. Dvorientchikova, G., D. Ivanov, Y. Panchin i V. I. Shestopalov (2006). "Expression of pannexin family of proteins in the retina." FEBS letters **580**(9): 2178-2182.
62. Ellwardt, E. i F. Zipp (2014). "Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS." Experimental neurology.
63. Engel, T., A. Jimenez-Pacheco, M. T. Miras-Portugal, M. Diaz-Hernandez i D. C. Henshall (2012). "P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control." Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol **4**(4): 174-187.
64. Feng, Y. H., X. Li, L. Wang, L. Zhou i G. I. Gorodeski (2006). "A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization." J Biol Chem **281**(25): 17228-17237.
65. Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, M. Dal Susino, L. Melchiorri, O. R. Baricordi i F. Di Virgilio (1997). "Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages." J Immunol **159**(3): 1451-1458.
66. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R. M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther i F. Di Virgilio (2006). "The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release." J Immunol **176**(7): 3877-3883.
67. Ferrari, D., S. Wesselborg, M. K. Bauer i K. Schulze-Osthoff (1997). "Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65." The Journal of cell biology **139**(7): 1635-1643.

68. Fischer, F. R., L. Santambrogio, Y. Luo, M. A. Berman, W. W. Hancock i M. E. Dorf (2000). "Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression." Journal of neuroimmunology **110**(1-2): 195-208.
69. Franciotta, D., R. Bergamaschi, G. Martino, E. Zardini, G. Desina i V. Cosi (1999). "Tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in plasma and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients treated with methylprednisolone." European cytokine network **10**(3): 431-436.
70. Franke, H., J. Grosche, H. Schadlich, U. Krugel, C. Allgaier i P. Illes (2001). "P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats." Neuroscience **108**(3): 421-429.
71. Franke, H., A. Gunther, J. Grosche, R. Schmidt, S. Rossner, R. Reinhardt, H. Faber-Zuschratter, D. Schneider i P. Illes (2004). "P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats." J Neuropathol Exp Neurol **63**(7): 686-699.
72. Franke, H., A. Gunther, J. Grosche, R. Schmidt, S. Rossner, R. Reinhardt, H. Faber-Zuschratter, D. Schneider i P. Illes (2004). "P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats." Journal of neuropathology and experimental neurology **63**(7): 686-699.
73. Franke, H., U. Krugel, R. Schmidt, J. Grosche, A. Reichenbach i P. Illes (2001). "P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo." Br J Pharmacol **134**(6): 1180-1189.
74. Freist, W., J. F. Verhey, W. Stuhmer i D. H. Gauss (1998). "ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases." FEBS Lett **434**(1-2): 61-65.
75. Froger, N., J. A. Orellana, C. F. Calvo, E. Amigou, M. G. Kozoriz, C. C. Naus, J. C. Saez i C. Giaume (2010). "Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective." Mol Cell Neurosci **45**(1): 37-46.
76. Fuller, S. J., L. Stokes, K. K. Skarratt, B. J. Gu i J. S. Wiley (2009). "Genetics of the P2X7 receptor and human disease." Purinergic Signal **5**(2): 257-262.
77. Gardner, T. W., E. Lieth, S. A. Khin, A. J. Barber, D. J. Bonsall, T. Leshner, K. Rice i W. A. Brennan, Jr. (1997). "Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(11): 2423-2427.
78. Gimenez, M. A., J. E. Sim i J. H. Russell (2004). "TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation." Journal of neuroimmunology **151**(1-2): 116-125.
79. Giunti, D., G. Borsellino, R. Benelli, M. Marchese, E. Capello, M. T. Valle, E. Pedemonte, D. Noonan, A. Albin, G. Bernardi, G. L. Mancardi, L. Battistini i A. Uccelli (2003). "Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS." J Leukoc Biol **73**(5): 584-590.
80. Gold, R., C. Linington i H. Lassmann (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." Brain : a journal of neurology **129**(Pt 8): 1953-1971.
81. Gonul, E., B. Duz, S. Kahraman, H. Kayali, A. Kubar i E. Timurkaynak (2002). "Early pericyte response to brain hypoxia in cats: an ultrastructural study." Microvasc Res **64**(1): 116-119.
82. Grimm, I., S. N. Ullsperger i H. Zimmermann (2010). "Nucleotides and epidermal growth factor induce parallel cytoskeletal rearrangements and migration in cultured adult murine neural stem cells." Acta physiologica **199**(2): 181-189.
83. Grygorowicz, T., L. Struzynska, G. Sulkowski, M. Chalimoniuk i D. Sulejczak (2010). "Temporal expression of P2X7 purinergic receptor during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis." Neurochem Int **57**(7): 823-829.
84. Grygorowicz, T., D. Sulejczak i L. Struzynska (2011). "Expression of purinergic P2X7 receptor in rat brain during the symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis and after recovery of neurological deficits." Acta Neurobiol Exp (Wars) **71**(1): 65-73.
85. Haanes, K. A., A. Schwab i I. Novak (2012). "The P2X7 receptor supports both life and death in fibrogenic pancreatic stellate cells." PLoS ONE **7**(12): e51164.

86. Hervas, C., R. Perez-Sen i M. T. Miras-Portugal (2005). "Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals." *Biochemical pharmacology* **70**(5): 770-785.
87. Holley, J. E., D. Gveric, J. Newcombe, M. L. Cuzner i N. J. Gutowski (2003). "Astrocyte characterization in the multiple sclerosis glial scar." *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**(5): 434-444.
88. Horai, R., M. Asano, K. Sudo, H. Kanuka, M. Suzuki, M. Nishihara, M. Takahashi i Y. Iwakura (1998). "Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion." *J Exp Med* **187**(9): 1463-1475.
89. Humphreys, B. D., J. Rice, S. B. Kertesz i G. R. Dubyak (2000). "Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor." *J Biol Chem* **275**(35): 26792-26798.
90. Inoue, K., K. Nakajima, T. Morimoto, Y. Kikuchi, S. Koizumi, P. Illes i S. Kohsaka (1998). "ATP stimulation of Ca²⁺-dependent plasminogen release from cultured microglia." *Br J Pharmacol* **123**(7): 1304-1310.
91. Jiang, L. H., J. M. Baldwin, S. Roger i S. A. Baldwin (2013). "Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms." *Front Pharmacol* **4**: 55.
92. Jiang, L. H., A. B. Mackenzie, R. A. North i A. Surprenant (2000). "Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors." *Mol Pharmacol* **58**(1): 82-88.
93. John, G. R., J. E. Simpson, M. N. Woodroffe, S. C. Lee i C. F. Brosnan (2001). "Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1beta signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(12): 4134-4142.
94. Kahlenberg, J. M. i G. R. Dubyak (2004). "Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release." *American journal of physiology. Cell physiology* **286**(5): C1100-1108.
95. Kampman, M. T. i M. Brustad (2008). "Vitamin D: a candidate for the environmental effect in multiple sclerosis - observations from Norway." *Neuroepidemiology* **30**(3): 140-146.
96. Kang, J., N. Kang, D. Lovatt, A. Torres, Z. Zhao, J. Lin i M. Nedergaard (2008). "Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP." *J Neurosci* **28**(18): 4702-4711.
97. Karpuk, N., M. Burkovetskaya, T. Fritz, A. Angle i T. Kielian (2011). "Neuroinflammation leads to region-dependent alterations in astrocyte gap junction communication and hemichannel activity." *J Neurosci* **31**(2): 414-425.
98. Kawamura, H., T. Sugiyama, D. M. Wu, M. Kobayashi, S. Yamanishi, K. Katsumura i D. G. Puro (2003). "ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina." *J Physiol* **551**(Pt 3): 787-799.
99. Kerschensteiner, M., C. Stadelmann, B. S. Buddeberg, D. Merkler, F. M. Bareyre, D. C. Anthony, C. Lington, W. Bruck i M. E. Schwab (2004). "Targeting experimental autoimmune encephalomyelitis lesions to a predetermined axonal tract system allows for refined behavioral testing in an animal model of multiple sclerosis." *The American journal of pathology* **164**(4): 1455-1469.
100. Keystone, E. C., M. M. Wang, M. Layton, S. Hollis i I. B. McInnes (2012). "Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine." *Annals of the rheumatic diseases* **71**(10): 1630-1635.
101. Kido, Y., C. Kawahara, Y. Terai, A. Ohishi, S. Kobayashi, M. Hayakawa, Y. Kamatsuka, K. Nishida i K. Nagasawa (2014). "Regulation of activity of P2X7 receptor by its splice variants in cultured mouse astrocytes." *Glia* **62**(3): 440-451.
102. Kim, J. E., H. J. Ryu, S. I. Yeo i T. C. Kang (2011). "P2X7 receptor differentially modulates astroglial apoptosis and clasmotodendrosis in the rat brain following status epilepticus." *Hippocampus* **21**(12): 1318-1333.

103. Kim, M., L. H. Jiang, H. L. Wilson, R. A. North i A. Surprenant (2001). "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex." *EMBO J* **20**(22): 6347-6358.
104. Kim, M., V. Spelta, J. Sim, R. A. North i A. Surprenant (2001). "Differential assembly of rat purinergic P2X7 receptor in immune cells of the brain and periphery." *J Biol Chem* **276**(26): 23262-23267.
105. Kim, W. I., H. J. Ryu, J. E. Kim, C. H. Seo, B. C. Lee, I. G. Choi i T. C. Kang (2013). "Differential nuclear factor-kappa B phosphorylation induced by lipopolysaccharide in the hippocampus of P2X7 receptor knockout mouse." *Neurol Res* **35**(4): 369-381.
106. Kindt, T. J., Ed. (2006). *Kuby immunology*.
107. Klapperstuck, M., C. Buttner, G. Schmalzing i F. Markwardt (2001). "Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor." *J Physiol* **534**(Pt 1): 25-35.
108. Kobayashi, K., E. Takahashi, Y. Miyagawa, H. Yamanaka i K. Noguchi (2011). "Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model." *Neurosci Lett* **504**(1): 57-61.
109. Komoszynski, M. i A. Wojtczak (1996). "Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases." *Biochim Biophys Acta* **1310**(2): 233-241.
110. Kornek, B., M. K. Storch, R. Weissert, E. Wallstroem, A. Stefferl, T. Olsson, C. Linington, M. Schmidbauer i H. Lassmann (2000). "Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions." *The American journal of pathology* **157**(1): 267-276.
111. Krishnamoorthy, G., H. Lassmann, H. Wekerle i A. Holz (2006). "Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation." *The Journal of clinical investigation* **116**(9): 2385-2392.
112. Krumbholz, M., D. Theil, S. Cepok, B. Hemmer, P. Kivisakk, R. M. Ransohoff, M. Hofbauer, C. Farina, T. Derfuss, C. Hartle, J. Newcombe, R. Hohlfeld i E. Meinl (2006). "Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment." *Brain : a journal of neurology* **129**(Pt 1): 200-211.
113. Krumbholz, M., D. Theil, T. Derfuss, A. Rosenwald, F. Schrader, C. M. Monoranu, S. L. Kalled, D. M. Hess, B. Serafini, F. Aloisi, H. Wekerle, R. Hohlfeld i E. Meinl (2005). "BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma." *J Exp Med* **201**(2): 195-200.
114. Kutzelnigg, A., C. F. Lucchinetti, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Bergmann, M. Schmidbauer, J. E. Parisi i H. Lassmann (2005). "Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis." *Brain* **128**(Pt 11): 2705-2712.
115. Kwiatkowska-Patzer, B., J. Michalkiewicz, I. Kubiszewska, J. Zielinska, K. Kasarello, K. Kurzepa i A. W. Lipkowski (2009). "Spinal cord hydrolysate ameliorate immunological reaction in experimental allergic encephalomyelitis." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **69**(1): 73-78.
116. Labasi, J. M., N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M. M. Payette, W. Brissette, J. R. Wicks, L. Audoly i C. A. Gabel (2002). "Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response." *J Immunol* **168**(12): 6436-6445.
117. Lai, C. H. i K. H. Kuo (2005). "The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte." *Brain Res Brain Res Rev* **50**(2): 258-265.
118. Lavrnja, I., D. Laketa, D. Savic, I. Bozic, I. Bjelobaba, S. Pekovic i N. Nedeljkovic (2015). "Expression of a second ecto-5'-nucleotidase variant besides the usual protein in symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Mol Neurosci* **55**(4): 898-911.
119. Lenercept (1999). "TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. ." *Neurology* **53**(3): 457-465.
120. Lenertz, L. Y., Z. Wang, A. Guadarrama, L. M. Hill, M. L. Gavala i P. J. Bertics (2010). "Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue important for receptor function." *Biochemistry* **49**(22): 4611-4619.

121. Li, S., M. Tomic i S. S. Stojilkovic (2011). "Characterization of novel Pannexin 1 isoforms from rat pituitary cells and their association with ATP-gated P2X channels." General and comparative endocrinology **174**(2): 202-210.
122. Litvin, O., A. Tiunova, Y. Connell-Alberts, Y. Panchin i A. Baranova (2006). "What is hidden in the pannexin treasure trove: the sneak peek and the guesswork." Journal of cellular and molecular medicine **10**(3): 613-634.
123. Locovei, S., E. Scemes, F. Qiu, D. C. Spray i G. Dahl (2007). "Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex." FEBS Lett **581**(3): 483-488.
124. Losy, J. (2013). Stwardnienie rozsiane. Lublin, Wydawnictwo CZELEJ.
125. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr i R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
126. Luessi, F., V. Siffrin i F. Zipp (2012). "Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies." Expert Rev Neurother **12**(9): 1061-1076; quiz 1077.
127. Lutz, S. E., E. Gonzalez-Fernandez, J. C. Ventura, A. Perez-Samartin, L. Tarassishin, H. Negoro, N. K. Patel, S. O. Suadiciani, S. C. Lee, C. Matute i E. Scemes (2013). "Contribution of pannexin1 to experimental autoimmune encephalomyelitis." PLoS One **8**(6): e66657.
128. Lyck, R. i B. Engelhardt (2012). "Going against the tide--how encephalitogenic T cells breach the blood-brain barrier." Journal of vascular research **49**(6): 497-509.
129. Ma, M., Q. Ren, J. C. Zhang i K. Hashimoto (2014). "Effects of Brilliant Blue G on Serum Tumor Necrosis Factor-alpha Levels and Depression-like Behavior in Mice after Lipopolysaccharide Administration." Clin Psychopharmacol Neurosci **12**(1): 31-36.
130. Mackenzie, A. B., M. T. Young, E. Adinolfi i A. Surprenant (2005). "Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors." J Biol Chem **280**(40): 33968-33976.
131. MacVicar, B. A. i R. J. Thompson (2010). "Non-junction functions of pannexin-1 channels." Trends in neurosciences **33**(2): 93-102.
132. Mahad, D., H. Lassmann i D. Turnbull (2008). "Review: Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis." Neuropathology and Applied Neurobiology **34**(6): 577-589.
133. Marcoli, M., C. Cervetto, P. Paluzzi, S. Guarnieri, S. Alloisio, S. Thellung, M. Nobile i G. Maura (2008). "P2X7 pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release." Journal of neurochemistry **105**(6): 2330-2342.
134. Mariathasan, S., D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack i V. M. Dixit (2006). "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP." Nature **440**(7081): 228-232.
135. Matute, C., E. Alberdi, M. Domercq, M. V. Sanchez-Gomez, A. Perez-Samartin, A. Rodriguez-Antiguedad i F. Perez-Cerda (2007). "Excitotoxic damage to white matter." J Anat **210**(6): 693-702.
136. Matute, C., I. Torre, F. Perez-Cerda, A. Perez-Samartin, E. Alberdi, E. Etxebarria, A. M. Arranz, R. Ravid, A. Rodriguez-Antiguedad, M. Sanchez-Gomez i M. Domercq (2007). "P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci **27**(35): 9525-9533.
137. Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, C. Yaschine, O. Gonzalez-Perez, D. Rowitch i A. Alvarez-Buylla (2006). "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **26**(30): 7907-7918.
138. Mika, T. i N. Prochnow (2012). "Functions of connexins and large pore channels on microglial cells: the gates to environment." Brain Res **1487**: 16-24.
139. Mishra, S. K., N. Braun, V. Shukla, M. Fullgrabe, C. Schomerus, H. W. Korf, C. Gachet, Y. Ikehara, J. Seigny, S. C. Robson i H. Zimmermann (2006). "Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation." Development **133**(4): 675-684.
140. Mitosek-Szewczyk, K., G. Sulkowski, Z. Stelmasiak i L. Struzynska (2008). "Expression of glutamate transporters GLT-1 and GLAST in different regions of rat brain during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis." Neuroscience **155**(1): 45-52.

141. Mrsulja, B. B., B. J. Mrsulja, T. Fujimoto, I. Klatzo i M. Spatz (1976). "Isolation of brain capillaries: a simplified technique." *Brain Res* **110**(2): 361-365.
142. Murgia, M., S. Hanau, P. Pizzo, M. Ripa i F. Di Virgilio (1993). "Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor." *J Biol Chem* **268**(11): 8199-8203.
143. Nair, A., T. J. Frederick i S. D. Miller (2008). "Astrocytes in multiple sclerosis: A product of their environment." *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**(17): 2702-2720.
144. Narcisse, L., E. Scemes, Y. Zhao, S. C. Lee i C. F. Brosnan (2005). "The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes." *Glia* **49**(2): 245-258.
145. Nedergaard, M., B. Ransom i S. A. Goldman (2003). "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." *Trends in neurosciences* **26**(10): 523-530.
146. Nicke, A., Y. H. Kuan, M. Masin, J. Rettinger, B. Marquez-Klaka, O. Bender, D. C. Gorecki, R. D. Murrell-Lagnado i F. Soto (2009). "A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice." *J Biol Chem* **284**(38): 25813-25822.
147. Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse i S. Tsukita (2003). "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." *The Journal of cell biology* **161**(3): 653-660.
148. North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-1067.
149. Norton, W. T. i S. E. Poduslo (1973). "Myelination in rat brain: method of myelin isolation." *J Neurochem* **21**(4): 749-757.
150. Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez i B. G. Weinshenker (2000). "Multiple sclerosis." *N Engl J Med* **343**(13): 938-952.
151. Ooi, Y. L., T. F. Khang, M. Naidu i K. C. Fong (2013). "The structural effect of intravitreal Brilliant blue G and Indocyanine green in rats eyes." *Eye (Lond)* **27**(3): 425-431.
152. Ortega, F., R. Perez-Sen, E. G. Delicado i M. T. Miras-Portugal (2009). "P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons." *Neurotox Res* **15**(3): 193-204.
153. Pannasch, U., L. Vargova, J. Reingruber, P. Ezan, D. Holcman, C. Giaume, E. Sykova i N. Rouach (2011). "Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(20): 8467-8472.
154. Parvathenani, L. K., S. Tertyshnikova, C. R. Greco, S. B. Roberts, B. Robertson i R. Posmantur (2003). "P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* **278**(15): 13309-13317.
155. Pearce, J. M. (2005). "Historical descriptions of multiple sclerosis." *Eur Neurol* **54**(1): 49-53.
156. Pelegrin, P. i A. Surprenant (2006). "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor." *EMBO J* **25**(21): 5071-5082.
157. Peng, W., M. L. Cotrina, X. Han, H. Yu, L. Bekar, L. Blum, T. Takano, G. F. Tian, S. A. Goldman i M. Nedergaard (2009). "Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(30): 12489-12493.
158. Penuela, S., R. Bhalla, X. Q. Gong, K. N. Cowan, S. J. Celetti, B. J. Cowan, D. Bai, Q. Shao i D. W. Laird (2007). "Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins." *Journal of cell science* **120**(Pt 21): 3772-3783.
159. Penuela, S., R. Bhalla, K. Nag i D. W. Laird (2009). "Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization." *Molecular biology of the cell* **20**(20): 4313-4323.
160. Persidsky, Y., S. H. Ramirez, J. Haorah i G. D. Kanmogne (2006). "Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions." *J Neuroimmune Pharmacol* **1**(3): 223-236.
161. Petkovic, F., J. Zivanovic, J. Blazevski, G. Timotijevic, M. Momcilovic, Z. Stanojevic, V. Stamenkovic, V. Milosevic, M. M. Stojkovic i D. Miljkovic (2015). "Activity, but not mRNA

- expression of gelatinases correlates with susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis." Neuroscience.
162. Pirko, I., C. F. Lucchinetti, S. Sriram i R. Bakshi (2007). "Gray matter involvement in multiple sclerosis." Neurology **68**(9): 634-642.
 163. Pitt, D., P. Werner i C. S. Raine (2000). "Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis." Nat Med **6**(1): 67-70.
 164. Planas, R., R. Martin i M. Sospedra (2014). "Long-term safety and efficacy of natalizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: impact on quality of life." Patient Relat Outcome Meas **5**: 25-33.
 165. Plant, S. R., H. A. Arnett i J. P. Ting (2005). "Astroglial-derived lymphotoxin-alpha exacerbates inflammation and demyelination, but not remyelination." Glia **49**(1): 1-14.
 166. Prat, A. i J. Antel (2005). "Pathogenesis of multiple sclerosis." Curr Opin Neurol **18**(3): 225-230.
 167. Pugliatti, M., H. F. Harbo, T. Holmoy, M. T. Kampman, K. M. Myhr, T. Riise i C. Wolfson (2008). "Environmental risk factors in multiple sclerosis." Acta neurologica Scandinavica. Supplementum **188**: 34-40.
 168. Rafalowska, J., S. Krajewski, E. Dolinska i D. Dziewulska (1992). "Does damage of perivascular astrocytes in multiple sclerosis plaques participate in blood-brain barrier permeability?" Neuropatol Pol **30**(1): 73-80.
 169. Ransohoff, R. M., T. A. Hamilton, M. Tani, M. H. Stoler, H. E. Shick, J. A. Major, M. L. Estes, D. M. Thomas i V. K. Tuohy (1993). "Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **7**(6): 592-600.
 170. Rash, J. E., T. Yasumura, F. E. Dudek i J. I. Nagy (2001). "Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **21**(6): 1983-2000.
 171. Ray, A., G. Zoidl, S. Weickert, P. Wahle i R. Dermietzel (2005). "Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system." The European journal of neuroscience **21**(12): 3277-3290.
 172. Redford, E. J., R. Kapoor i K. J. Smith (1997). "Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible." Brain : a journal of neurology **120 (Pt 12)**: 2149-2157.
 173. Ridderstrom, M. i M. Ohlsson (2014). "Brilliant blue G treatment facilitates regeneration after optic nerve injury in the adult rat." Neuroreport **25**(17): 1405-1410.
 174. Ridet, J. L., S. K. Malhotra, A. Privat i F. H. Gage (1997). "Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function." Trends in neurosciences **20**(12): 570-577.
 175. Ridge, S. C., A. E. Sloboda, R. A. McReynolds, S. Levine, A. L. Oronsky i S. S. Kerwar (1985). "Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone." Clin Immunol Immunopathol **35**(1): 35-42.
 176. Rodriguez-Zayas, A. E., A. I. Torrado, O. R. Rosas, J. M. Santiago, J. D. Figueroa i J. D. Miranda (2012). "Blockade of P2 nucleotide receptors after spinal cord injury reduced the gliotic response and spared tissue." Journal of molecular neuroscience : MN **46**(1): 167-176.
 177. Rubini, P., G. Pagel, S. Mehri, P. Marquardt, T. Riedel i P. Illes (2014). "Functional P2X7 receptors at cultured hippocampal astrocytes but not neurons." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.
 178. Rudick, R. A. i S. E. Goelz (2011). "Beta-interferon for multiple sclerosis." Exp Cell Res **317**(9): 1301-1311.
 179. Ruggieri, M., C. Avolio, P. Livrea i M. Trojano (2007). "Glatiramer acetate in multiple sclerosis: a review." CNS Drug Rev **13**(2): 178-191.
 180. Ryu, H. J., J. E. Kim, S. I. Yeo i T. C. Kang (2011). "p65/RelA-Ser529 NF-kappaB subunit phosphorylation induces autophagic astroglial death (Clasmatodendrosis) following status epilepticus." Cell Mol Neurobiol **31**(7): 1071-1078.

181. Ryu, H. J., J. E. Kim, S. I. Yeo, D. W. Kim, O. S. Kwon, S. Y. Choi i T. C. Kang (2011). "F-actin depolymerization accelerates clasmotodendrosis via activation of lysosome-derived autophagic astroglial death." Brain Res Bull **85**(6): 368-373.
182. Ryu, J. K., N. Jantaratnotai, M. C. Serrano-Perez, P. L. McGeer i J. G. McLarnon (2011). "Block of purinergic P2X7R inhibits tumor growth in a C6 glioma brain tumor animal model." Journal of neuropathology and experimental neurology **70**(1): 13-22.
183. Ryu, J. K., N. Jantaratnotai, M. C. Serrano-Perez, P. L. McGeer i J. G. McLarnon (2011). "Block of purinergic P2X7R inhibits tumor growth in a C6 glioma brain tumor animal model." J Neuropathol Exp Neurol **70**(1): 13-22.
184. Sa-Pereira, I., D. Brites i M. A. Brito (2012). "Neurovascular unit: a focus on pericytes." Molecular neurobiology **45**(2): 327-347.
185. Sawcer, S., M. Maranian, E. Setakis, V. Curwen, E. Akesson, A. Hensiek, F. Coraddu, R. Roxburgh, D. Sawcer, J. Gray, J. Deans, P. N. Goodfellow, N. Walker, D. Clayton i A. Compston (2002). "A whole genome screen for linkage disequilibrium in multiple sclerosis confirms disease associations with regions previously linked to susceptibility." Brain **125**(Pt 6): 1337-1347.
186. Schmitt, C., N. Strazielle i J. F. Ghersi-Egea (2012). "Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain." Journal of Neuroinflammation **9**: 187.
187. Schwaninger, M., S. Sallmann, N. Petersen, A. Schneider, S. Prinz, T. A. Libermann i M. Spranger (1999). "Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB." Journal of neurochemistry **73**(4): 1461-1466.
188. Schwarz, N., L. Drouot, A. Nicke, R. Fliegert, O. Boyer, A. H. Guse, F. Haag, S. Adriouch i F. Koch-Nolte (2012). "Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation." PLoS One **7**(7): e41269.
189. Selmaj, K., C. S. Raine, B. Cannella i C. F. Brosnan (1991). "Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions." J Clin Invest **87**(3): 949-954.
190. Sharp, A. J., P. E. Polak, V. Simonini, S. X. Lin, J. C. Richardson, E. R. Bongarzone i D. L. Feinstein (2008). "P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis." Journal of Neuroinflammation **5**(1): 33.
191. Shukla, V., H. Zimmermann, L. Wang, H. Kettenmann, S. Raab, K. Hammer, J. Sevigny, S. C. Robson i N. Braun (2005). "Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus." Journal of neuroscience research **80**(5): 600-610.
192. Skaper, S. D., P. Debetto i P. Giusti (2010). "The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders." FASEB J **24**(2): 337-345.
193. Smith, K. J. (2007). "Sodium channels and multiple sclerosis: roles in symptom production, damage and therapy." Brain pathology **17**(2): 230-242.
194. Smith, K. J., R. Kapoor i P. A. Felts (1999). "Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species." Brain pathology **9**(1): 69-92.
195. Solini, A., P. Chiozzi, A. Morelli, E. Adinolfi, R. Rizzo, O. R. Baricordi i F. Di Virgilio (2004). "Enhanced P2X7 activity in human fibroblasts from diabetic patients: a possible pathogenetic mechanism for vascular damage in diabetes." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(7): 1240-1245.
196. Solini, A., P. Chiozzi, A. Morelli, R. Fellin i F. Di Virgilio (1999). "Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release." J Cell Sci **112 (Pt 3)**: 297-305.
197. Song, X. M., X. H. Xu, J. Zhu, Z. Guo, J. Li, C. He, G. Burnstock, H. Yuan i Z. Xiang (2015). "Up-regulation of P2X7 receptors mediating proliferation of Schwann cells after sciatic nerve injury." Purinergic Signal **11**(2): 203-213.

198. Sozen, T., R. Tsuchiyama, Y. Hasegawa, H. Suzuki, V. Jadhav, S. Nishizawa i J. H. Zhang (2009). "Role of interleukin-1beta in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice." Stroke **40**(7): 2519-2525.
199. Sperlagh, B. i P. Illes (2014). "P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases." Trends Pharmacol Sci **35**(10): 537-547.
200. Sperlagh, B., A. Kofalvi, J. Deuchars, L. Atkinson, C. J. Milligan, N. J. Buckley i E. S. Vizi (2002). "Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus." Journal of neurochemistry **81**(6): 1196-1211.
201. Sperlagh, B., E. S. Vizi, K. Wirkner i P. Illes (2006). "P2X7 receptors in the nervous system." Prog Neurobiol **78**(6): 327-346.
202. Stover, J. F., U. E. Pleines, M. C. Morganti-Kossmann, T. Kossmann, K. Lowitzsch i O. S. Kempfski (1997). "Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity." Eur J Clin Invest **27**(12): 1038-1043.
203. Struzynska, L. (2000). "The protective role of astroglia in the early period of experimental lead toxicity in the rat." Acta Neurobiol Exp (Wars) **60**(2): 167-173.
204. Suadicani, S. O., C. F. Brosnan i E. Scemes (2006). "P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **26**(5): 1378-1385.
205. Sulkowski, G., B. Dabrowska-Bouta, E. Salinska i L. Struzynska (2014). "Modulation of glutamate transport and receptor binding by glutamate receptor antagonists in EAE rat brain." PLoS ONE **9**(11): e113954.
206. Sulkowski, G., B. Dabrowska-Bouta i L. Struzynska (2013). "Modulation of neurological deficits and expression of glutamate receptors during experimental autoimmune encephalomyelitis after treatment with selected antagonists of glutamate receptors." Biomed Res Int **2013**: 186068.
207. Sunnemark, D., S. Eltayeb, M. Nilsson, E. Wallstrom, H. Lassmann, T. Olsson, A. L. Berg i A. Ericsson-Dahlstrand (2005). "CX3CL1 (fractalkine) and CX3CR1 expression in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: kinetics and cellular origin." Journal of Neuroinflammation **2**: 17.
208. Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North i G. Buell (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." Science **272**(5262): 735-738.
209. Swiderski, R. M. (1998). Multiple sclerosis through history and human life. North Carolina, McFarland & Company
210. Hart, B. A., M. van Meurs, H. P. Brok, L. Massacesi, J. Bauer, L. Boon, R. E. Bontrop i J. D. Laman (2000). "A new primate model for multiple sclerosis in the common marmoset." Immunology today **21**(6): 290-297.
211. Takenouchi, T., Y. Iwamaru, M. Imamura, N. Kato, S. Sugama, M. Fujita, M. Hashimoto, M. Sato, H. Okada, T. Yokoyama, S. Mohri i H. Kitani (2007). "Prion infection correlates with hypersensitivity of P2X7 nucleotide receptor in a mouse microglial cell line." FEBS Lett **581**(16): 3019-3026.
212. Tanasescu, R., C. Ionete, I. J. Chou i C. S. Constantinescu (2014). "Advances in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis." Biomed J **37**(2): 41-49.
213. Teixeira, J. M., M. C. de Oliveira-Fusaro, C. A. Parada i C. H. Tambeli (2014). "Peripheral P2X7 receptor-induced mechanical hyperalgesia is mediated by bradykinin." Neuroscience **277**: 163-173.
214. Theodoric, N., J. F. Bechberger, C. C. Naus i W. C. Sin (2012). "Role of gap junction protein connexin43 in astrogliosis induced by brain injury." PLoS ONE **7**(10): e47311.
215. Torres, G. E., T. M. Egan i M. M. Voigt (1999). "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners." J Biol Chem **274**(10): 6653-6659.

216. Tsunoda, I. i R. S. Fujinami (1996). "Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus." Journal of neuropathology and experimental neurology **55**(6): 673-686.
217. Ulrich, H., M. P. Abbracchio i G. Burnstock (2012). "Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells: implications for CNS development and repair." Stem cell reviews **8**(3): 755-767.
218. van der Mei, I. A., A. L. Ponsonby, T. Dwyer, L. Blizzard, R. Simmons, B. V. Taylor, H. Butzkueven i T. Kilpatrick (2003). "Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study." BMJ **327**(7410): 316.
219. Van Der Voorn, P., J. Tekstra, R. H. Beelen, C. P. Tensen, P. Van Der Valk i C. J. De Groot (1999). "Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions." The American journal of pathology **154**(1): 45-51.
220. von Boyen, G. B., M. Steinkamp, M. Reinshagen, K. H. Schafer, G. Adler i J. Kirsch (2004). "Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia." Gut **53**(2): 222-228.
221. Wallstrom, E., R. Weissert, J. Lorentzen i T. Olsson (1997). "Major histocompatibility complex haplotype RT1av1 is associated with relapsing/remitting experimental autoimmune encephalomyelitis." Transplant Proc **29**(3): 1686-1689.
222. Wang, D., M. M. Ayers, D. V. Catmull, L. J. Hazelwood, C. C. Bernard i J. M. Orian (2005). "Astrocyte-associated axonal damage in pre-onset stages of experimental autoimmune encephalomyelitis." Glia **51**(3): 235-240.
223. Wang, X., G. Arcuino, T. Takano, J. Lin, W. G. Peng, P. Wan, P. Li, Q. Xu, Q. S. Liu, S. A. Goldman i M. Nedergaard (2004). "P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury." Nat Med **10**(8): 821-827.
224. Weiner, H. L. (2009). "The challenge of multiple sclerosis: How do we cure a chronic heterogeneous disease?" Annals of Neurology **65**(3): 239-248.
225. Wekerle, H. i F. C. Kurschus (2006). "Animal models of multiple sclerosis." Drug Discovery Today: Disease Models **3**(4): 359-367.
226. Williams, A., G. Piaton i C. Lubetzki (2007). "Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis?" Glia **55**(13): 1300-1312.
227. Williams, K. C., S. Corey, S. V. Westmoreland, D. Pauley, H. Knight, C. deBakker, X. Alvarez i A. A. Lackner (2001). "Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS." J Exp Med **193**(8): 905-915.
228. Witting, A., L. Chen, E. Cudaback, A. Straiker, L. Walter, B. Rickman, T. Moller, C. Brosnan i N. Stella (2006). "Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6362-6367.
229. Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, J. Kraus, G. Rascher-Eggstein, S. Liebner, S. Hamm, F. Duffner, E. H. Grote, W. Risau i B. Engelhardt (2003). "Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme." Acta Neuropathol **105**(6): 586-592.
230. Yamamoto, R., Y. Okada, J. Hirose, T. Koshika, Y. Kawato, M. Maeda, R. Saito, K. Hattori, H. Harada, Y. Nagasaka i T. Morokata (2014). "ASP4058, a novel agonist for sphingosine 1-phosphate receptors 1 and 5, ameliorates rodent experimental autoimmune encephalomyelitis with a favorable safety profile." PLoS ONE **9**(10): e110819.
231. Yednock, T. A., C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman i N. Karin (1992). "Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin." Nature **356**(6364): 63-66.
232. Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochimica et biophysica acta **1783**(5): 673-694.
233. Yen, M. R. i M. H. Saier, Jr. (2007). "Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily." Progress in biophysics and molecular biology **94**(1-2): 5-14.

234. Yiangou, Y., P. Facer, P. Durrenberger, I. P. Chessell, A. Naylor, C. Bountra, R. R. Banati i P. Anand (2006). "COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord." BMC Neurol **6**: 12.
235. Yin, L., Y. Chen, Z. Qu, L. Zhang, Q. Wang, Q. Zhang i L. Li (2014). "Involvement of JAK/STAT signaling in the effect of cornel iridoid glycoside on experimental autoimmune encephalomyelitis amelioration in rats." J Neuroimmunol **274**(1-2): 28-37.
236. Ying, Y. L., X. H. Wei, X. B. Xu, S. Z. She, L. J. Zhou, J. Lv, D. Li, B. Zheng i X. G. Liu (2014). "Over-expression of P2X7 receptors in spinal glial cells contributes to the development of chronic postsurgical pain induced by skin/muscle incision and retraction (SMIR) in rats." Exp Neurol **261**: 836-843.
237. Young, C. N., W. Brutkowski, C. F. Lien, S. Arkle, H. Lochmuller, K. Zablocki i D. C. Gorecki (2012). "P2X7 purinoceptor alterations in dystrophic mdx mouse muscles: relationship to pathology and potential target for treatment." J Cell Mol Med **16**(5): 1026-1037.
238. Zappala, A., D. Cicero, M. F. Serapide, C. Paz, M. V. Catania, M. Falchi, R. Parenti, M. R. Panto, F. La Delia i F. Cicerata (2006). "Expression of pannexin1 in the CNS of adult mouse: cellular localization and effect of 4-aminopyridine-induced seizures." Neuroscience **141**(1): 167-178.
239. Zappala, A., G. Li Volti, M. F. Serapide, R. Pellitteri, M. Falchi, F. La Delia, V. Cicerata i F. Cicerata (2007). "Expression of pannexin2 protein in healthy and ischemized brain of adult rats." Neuroscience **148**(3): 653-667.
240. Zlokovic, B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." Neuron **57**(2): 178-201.