mgr Magdalena Wiktoria Sokołowska

Tytuł pracy: *„Ocena apoptozy w procesie starzenia kory móżdżku u myszy niewytwarzających interleukiny 6”*

STRESZCZENIE

Starzenie się organizmów wielokomórkowych jest procesem uniwersalnym, występującym powszechnie, dotyczącym również organizmu człowieka. Na przestrzeni ostatnich 100 lat długość życia uległa znacznemu wydłużeniu, a populacja osób starszych potrojeniu. Prognozuje się, iż do roku 2025 osoby powyżej 65 roku życia w krajach rozwiniętych będą stanowiły 20% populacji. Wzrastająca z wiekiem oraz w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych ekspresja IL-6 została uznana za swoisty akcelerator procesu starzenia, a występujące w tym procesie objawy ze strony OUN od wielu lat wiązane są z utratą komórek nerwowych. Przeprowadzone przed kilkoma laty badania wykazały, iż u naczelnych 80% neuronów OUN jest zlokalizowanych w móżdżku, a komórkami szczególnie wrażliwymi na zmiany związane z procesem starzenia, których utrata sięga 30%, są komórki Purkinjego.

Ponieważ degenerujące komórki są eliminowane z tkanek na drodze apoptozy, w niniejszej pracy podjęto próbę wyjaśnienia, czy wrodzony brak IL-6 wpływa na proces apoptotycznej śmierci komórek kory móżdżku oraz na mechanizmy molekularne związane z regulacją tego procesu.

Doświadczenia przeprowadzono na korze móżdżku pobranej od 40-stu samców myszy w wieku 4 i 24 miesięcy szczepu C57BL/6J, z których połowa była pozbawiona funkcjonalnego genu interleukiny 6 C57BL/6J $^{IL6\text{-}/\text{-}tm1Kopf}$ (IL-6 KO). Pozostałe zwierzęta stanowiły grupy referencyjne (WT, ang. *wild type*).

Obraz morfologiczny kory móżdżku oceniono na skrawkach parafinowych barwionych hemetoksyliną i eozyną. Ocenę stopnia apoptozy komórek kory móżdżku przeprowadzono metodą TUNEL oraz barwieniem immunohistochemicznym na obecność aktywnej kaspazy 3. Przy użyciu metody fluorescencyjnej oceniono lokalizacją astrocytarnego białka GFAP oraz autofluorescencję ziarnistości lipofuscyny. Ponadto przy użyciu metody Western blotting oceniono ekspresję białek zaangażowanych w proces apoptozy: białka p53, MDM-2, Bax i Bcl-2 oraz występującego w astrocytach białka GFAP.

Przeprowadzone badania wykazały, iż bezwzględna masa móżdżku nie różniła się u 4-miesięcznych zwierząt obu genotypów. Podczas gdy masa móżdżku u starych 24-miesięcznych myszy szczepu WT ulegała niewielkiemu obniżeniu, u starych zwierząt IL-6 KO wzrastała, osiągając istotnie statystycznie wyższą wartość w porównaniu do starych myszy szczepu WT.

W obrazie morfologicznym kory móżdżku młodych zwierząt należących do obu genotypów w barwieniu H+E stwierdzono prawidłową strukturę narządu z zachowaną budową wszystkich warstw korowych. Natomiast u 24-miesięcznych zwierząt zaobserwowano wyraźne zmiany w warstwie komórek Purkinjego. Liczne komórki tej warstwy wykazywały cechy zwyrodnienia, takie jak obkurczenie perikarionu i utratę charakterystycznego gruszkowatego kształtu, zwiększoną kwasochłonność cytoplazmy oraz zatarcie struktury jądra, a w niektórych komórkach jądra piknotyczne. Podczas gdy warstwa komórek Purkinjego u młodych zwierząt na przekroju kory móżdżku charakteryzowała się uporządkowanym, szeregowym ułożeniem, u starych zwierząt stwierdzono występowanie znacznych przerw pomiędzy komórkami Purkinjego wskazujących na ich ubytek. Opisane zmiany morfologiczne były bardziej nasilone u 24-miesięcznych zwierząt szczepu WT, w porównaniu do odpowiadających im wiekowo myszy niewytwarzających IL-6.

Ponieważ procesowi starzenia OUN towarzyszy hiperplazja i hipertrofia komórek glejowych wykonano ocenę tkanki glejowej metodą immunofluorescencyjną wskazującą lokalizację charakterystycznego dla astrocytów białka GFAP. U młodych zwierząt obu genotypów ilość świecącego produktu białkowego była niewielka, natomiast w korze móżdżku starych zwierząt obu genotypów zaobserwowano intensywną reakcję zlokalizowaną w obrębie perikarionów komórek glejowych, jak również widoczną na przekrojach ich dendrytów. Reakcja ta była bardziej nasilona w korze móżdżku 24-miesięcznych myszy szczepu WT, niż IL-6 KO, co zostało potwierdzone badaniem Western blotting, w którym ekspresja białka GFAP uległa istotnie statystycznemu wzrostowi u starych zwierząt szczepu WT w odniesieniu do odpowiadających im genotypowo zwierząt młodych oraz była wyższa u starych myszy szczepu WT w porównaniu do starych zwierząt IL-6 KO.

Ponadto w badaniach wykonanych przy użyciu metody fluorescencyjnej w perikarionach komórek Purkinjego oraz w towarzyszących im komórkach glejowych Bergmanna 24-miesięcznych zwierząt obu genotypów wykazano autofluorescencję ziarnistości, znacznie bardziej nasiloną u zwierząt szczepu WT. W celu wyjaśnienia znaczenia procesu apoptozy w mechanizmie śmierci komórek w zaobserwowanej utracie komórek Purkinjego w okresie starzenia wykonano barwienie metodą TUNEL, służącą do wykrywania jąder komórek apoptotycznych. W żadnej z warstw kory móżdżku pobranej od młodych zwierząt obu genotypów nie stwierdzono komórek

TUNEL–pozytywnych, natomiast u starych zwierząt zaobserwowano jedynie pojedyncze komórki apoptotyczne. W celu potwierdzenia niskiej aktywności apoptotycznej starzejącej się kory móżdżku wykonano barwienie immunohistochemiczne w kierunku aktywnej formy kaspazy 3. Brak reakcji na kaspazę 3 w komórkach wszystkich warstw kory móżdżku, przy jednocześnie intensywnej reakcji w komórkach splotu naczyniastego potwierdził wynik badania metodą TUNEL wskazujący, iż występująca w procesie starzenia utrata komórek Purkinjego jest spowodowana innym procesem, niż proces apoptozy.

W celu wyjaśnienia podłoża molekularnego zachodzących w procesie starzenia kory móżdżku zmian wykonano ocenę ekspresji białka p53, aktywowanego uszkodzeniem komórki, a szczególnie jej materiału genetycznego, białka MDM-2, pełniącego rolę negatywnego regulatora białka p53, proapoptotycznego białka Bax oraz antyapoptotycznego białka Bcl-2. Przeprowadzone badania wykazały istotny statystycznie wzrost ekspresji białka p53 u 24-miesięcznych zwierząt obu genotypów w odniesieniu do referencyjnych szczepów młodych myszy bez zmian w ekspresji białka MDM-2. Pomimo, iż ekspresja białka p53 u starych zwierząt IL-6 KO w porównaniu do młodych zwierząt tego genotypu wzrosła istotnie statystycznie, wzrost ten był istotnie statystycznie niższy w porównaniu do starych zwierząt szczepu WT, u których ilość białka p53 wzrosła ponad 20-krotnie. Niewielki wzrost ekspresji biała Bax u 24-miesięcznych zwierząt obu genotypów wyjaśnił brak odpowiedzi apoptotycznej, pomimo znacznego nagromadzenia białka p53. Również ekspresja białka Bcl-2 wykazała jedynie niewielką tendencję wzrostową u starych zwierząt WT i IL-6 KO.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Proces apoptozy nie odgrywa istotnej roli w utracie komórek Purkinjego w fizjologicznym procesie starzenia u myszy, na co wskazuje obecność pojedynczych komórek TUNEL-pozytywnych w korze móżdżku u 24-miesięcznych zwierząt obu genotypów oraz brak istotnych zmian w ekspresji genu Bax i reakcji w kierunku aktywnej formy kaspazy 3, pomimo istotnego wzrostu u tych zwierząt ekspresji białka p53.
2. Wrodzony brak IL-6 zapobiega występującej w procesie starzenia akumulacji zmian patologicznych, na co wskazuje mniejsze nasilenie zmian neurodegeneracyjnych w komórkach Purkinjego oraz istotnie statystycznie niższa ekspresja białka p53 w korze móżdżku 24-miesięcznych zwierząt niewytwarzających IL-6, w porównaniu do odpowiadających im wiekowo zwierząt WT.
3. Brak IL-6 zmniejsza nasilenie występującej w procesie starzenia mózgu aktywacji tkanki glejowej, na co wskazuje mniej nasilona reakcja immunofluorescencyjna uwidaczniająca astrocytarne białko GFAP w korze móżdżku 24-miesięcznych zwierząt IL-6 KO w porównaniu

do odpowiadających im wiekowo zwierząt WT, potwierdzona istotnie statystycznie niższą ekspresją tego białka.

4. Przeprowadzone badania wskazują, iż wrodzony brak ekspresji IL-6 powoduje spowolnienie rozwoju związanych z wiekiem zmian patologicznych w korze móżdżku, wywołanych występującą w procesie starzenia aktywacją tkanki glejowej, odpowiedzialną za utrzymywanie się w OUN stanu zapalnego.