

STRESZCZENIE

Kwercetyna (Q) spożywana z dietą, może działać ochronnie na komórki ośrodkowego układu nerwowego zapobiegając szkodliwemu działaniu stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych. Neuroprotekcyjne działanie Q zależy od jej stężenia w mózgu, które regulowane jest na poziomie bariery krew-mózg i bariery-krew płyn mózgowo-rdzeniowy (płyn m-r), zlokalizowanej w nabłonku spłotu naczyń włosowatych (SN) komór mózgu. W osoczu krwi aglikon Q, wolna forma związku, praktycznie nie występuje a dominującą formą jest glukuronid Q (Q3GA), uznawany za bardziej stabilną formę Q, służącą do transportu z krwią do tkanek, gdzie potencjalnie może podlegać lokalnie procesowi dekoniugacji, czyli odłączenia reszty kwasu glukuronowego przez β -glukuronidazę (β -gluk) i uwolnienia aglikonu Q, który z łatwością dyfunduje przez błony komórkowe. W płynie m-r owiec, którym doświadczowo podano zawiesinę łusek cebuli, Q występuje głównie w postaci aglikonu Q i jej biologicznie aktywnej metylowanej pochodnej – izoramnetyny (iR), natomiast Q3GA i glukuronid iR (iRGA) stanowią około 12%. Wskazuje to na przechodzenie Q i iR przez bariery mózgowia, oraz na możliwość lokalnej dekoniugacji glukuronidów Q. W SN wykazano zarówno obecność β -gluk, jak i Q3GA. Rezydują w nim również makrofagi odgrywające kluczową rolę w procesie dekoniugacji. Ostry stan zapalny stymuluje aktywność β -gluk w krwi, aktywuje makrofagi, jak również zwiększa ekspresję chemokin w SN, co prowadzi do wzrostu napływu komórek układu odpornościowego i potencjalnie zwiększa możliwość lokalnej dekoniugacji Q3GA w SN i płynie m-r i w konsekwencji wzrostu stężenia aglikonu Q w płynie m-r.

Celem pracy jest weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej, że ostry stan zapalny: 1) zwiększa ekspresję β -gluk w SN i jej aktywność w SN i w płynie m-r, i 2) wpływa na kumulację Q3GA w SN oraz na stężenie Q i jej metabolitów w płynie m-r. Szczegółowe zadania badawcze dotyczyły określenia wpływu stanu zapalnego na: 1) ekspresję genu kodującego β -gluk (*GUSB*) oraz aktywność β -gluk w SN (*in vivo*) i w komórkach nabłonka SN (*in vitro*), 2) aktywność β -gluk w osoczu krwi, płynie m-r i w medium z hodowli komórek nabłonka SN, 3) kumulację Q3GA w SN i w komórkach nabłonka SN oraz 4) stężenie Q i jej metabolitów w krwi i płynie m-r.

Badania przeprowadzono na dojrzałych płciowo samicach owiec (n=46) oraz na komórkach nabłonka SN szczura i linii komórek nabłonka SN człowieka (HPCPP). Stan zapalny indukowano lipopolisacharydem (LPS) w dawkach 400 ng/kg mc. lub 5 μ g/ml medium. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta otrzymujące płyn fizjologiczny i komórki bez dodatku LPS do

medium. Krew i płyn m-r pobierano odpowiednio przez kateter założony do żyły szyjnej zewnętrznej i kaniulę implantowaną do III komory mózgu. W przebiegu doświadczeń *in vivo*, Q3GA podawano w dawkach: 6 mg/60 kg mc. (zadanie 2 i 4) i 11,5 mg/60 kg mc. (zadanie 3), a w warunkach *in vitro* 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M. Odpowiedź na indukcję stanu zapalnego w warunkach *in vivo* weryfikowano na podstawie temperatury ciała, zachowania zwierząt, stężenia kortyzolu w osoczu krwi oraz ekspresji genów kodujących chemokiny (*CCL2* i *CXCL1*) w SN, natomiast w warunkach *in vitro* na podstawie ekspresji genów kodujących wybrane cytokiny prozapalne i chemokiny (*Cxcl1*, *Il6* i *Il8*). Ekspresję genów analizowano metodą real time PCR, natomiast aktywność β -gluk i stężenie Q i jej metabolitów, odpowiednio, metodą kolorymetryczną i HPLC-MS/MS.

Wykazano ekspresję *GUSB* w SN owiec, w komórkach nabłonka SN szczura i w linii HIPCPP oraz aktywność β -gluk w SN, krwi, płynie m-r, komórkach nabłonka SN szczura i w linii HIPCPP oraz brak aktywności tego enzymu w medium. Nie stwierdzono wpływu stanu zapalnego na ekspresję *GUSB* w SN owcy oraz na aktywność β -gluk w płynie m-r, natomiast stwierdzono wzrost ($p \leq 0,05$) aktywności β -gluk w osoczu krwi i w SN, odpowiednio w 1. i 3. godzinie od podania LPS. W warunkach *in vitro*, nie zaobserwowano wpływu LPS zarówno na ekspresję *GUSB*, jak i na aktywność β -gluk w komórkach nabłonka SN szczura, w linii HIBCPP oraz w medium. Po dożylnym podaniu Q3GA nie stwierdzono kumulacji Q3GA w SN owiec w obu badanych grupach, zaobserwowano natomiast, zależną od dawki kumulację Q3GA na powierzchni komórek linii HIBCPP, której poziom nie zmienił się pod wpływem LPS. W wyniku dożylnego podania Q3GA nastąpił wzrost ($p \leq 0,05$) jego stężenia w osoczu krwi w obu badanych grupach owiec, przy czym był on istotnie ($p \leq 0,05$) większy w grupie LPS (675 ± 458 nmol/L), niż w grupie kontrolnej (210 ± 180 nmol/L). Nie stwierdzono natomiast zmian stężenia Q i jej metabolitów w płynie m-r. W osoczu krwi owiec oraz w płynie m-r nie stwierdzono wpływu ostrego stanu zapalnego na zawartość Q3GA, Q, iR i iRGA, mierzonych polem powierzchni pod krzywą ich stężenia w czasie.

Uzyskane wyniki wskazują, że ostry stan zapalny stymuluje aktywność β -gluk w SN i w krwi, ale nie w płynie m-r oraz nie wpływa na stężenie Q i jej metabolitów w płynie m-r u owiec otrzymujących dożylnie Q3GA. Wskazuje to na brak dekoniugacji Q3GA w SN, w badanych warunkach, jednak nie wyklucza zachodzenia tego procesu w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań.