

7. STRESZCZENIE

Depresją określamy zespół chorób afektywnych, a jej etiopatogeneza została tylko częściowo poznana. Współczesne teorie podkreślają znaczenie zaburzonej interakcji układów nerwowego, hormonalnego i immunologicznego w patomechanizmach depresji. Szczególne zainteresowanie w ostatnich latach wzbudzają dysfunkcje w obrębie układów białkowych chemokina – receptor chemokiny jako potencjalne podłoże rozwoju zaburzeń depresyjnych. Powyższe białka modulują funkcje komórek układu nerwowego, kontrolują procesy neurorozwojowe oraz neurotransmisję, pośredniczą w komunikacji pomiędzy neuronami a komórkami glejowymi oraz odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów homeostazy w mózgu. Pomimo tak istotnych przesłanek, przeprowadzono dotychczas tylko nieliczne badania dotyczące udziału chemokin i ich receptorów w mechanizmach działania leków przeciwdepresyjnych.

Dlatego celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było określenie wpływu oraz potencjalnych mechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych (tianeptyna, wenlafaksyna oraz fluoksetyna) należących do różnych grup na wybrane układy chemokin i ich receptorów, w warunkach *in vitro* hodowli organotypowych hipokampa, a następnie ich weryfikacja *in vivo* w obszarach mózgu szczególnie zaangażowanych w patofizjologię depresji (kora czołowa oraz hipokamp) u dorosłego 3-miesięcznego potomstwa.

Wszystkie badania zaprezentowane w pracy przeprowadzono porównawczo w układach kontrolnych oraz doświadczalnych w zwierzęcym modelu depresji opartym na stresie prenatalnym. Ciężarne samice szczurów szczepu Sprague-Dawley poddawano stresowi unieruchomienia oraz oświetlenia silnym światłem (trzy razy dziennie po 45 minut) od 14. dnia ciąży do dnia porodu. Spośród leków przeciwdepresyjnych wybrano do badań *in vitro* inhibitor wychwytu serotoniny i noradrenaliny – wenlafaksynę oraz lek atypowy – tianeptynę, natomiast w badaniach *in vivo* stosowano także selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny – fluoksetynę.

Do zaprezentowanych w rozprawie badań *in vitro* wybrano organotypowe hodowle hipokampa, które są przydatne do analiz nie tylko zależności pomiędzy układem nerwowym, immunologicznym oraz endokrynnym, ale także fizjologicznych interakcji między komórkami mózgu dzięki zachowaniu funkcjonalnych połączeń. Stosując ten model

wykazano, że stres prenatalny w hodowlach hipokampa uzyskanych od 6-7-dniowego potomstwa zaburza układy chemokin i ich receptorów oraz nasila syntezę cytokin prozapalnych (IL-1 β IL-18). Stres w okresie ciąży zwiększa także wrażliwość hipokampa na stymulację endotoksyną bakteryjną (LPS). Przeprowadzone badania wskazują na normalizujące działanie tianeptyny oraz wenlafaksyny na układy ligand – receptor: CX3CL1-CX3CR1, CXCL12-CXCR4/CXCR7 oraz CCL2-CCR2, co sugerować może istotną rolę tych układów nie tylko w patomechanizmach stresu, ale także w mechanizmach działania leków przeciwdepresyjnych.

W drugiej części rozprawy zaprezentowano badania u 3-miesięcznych samców, u których przeprowadzono weryfikację behawioralną zastosowanego modelu. Potwierdzono, że stres prenatalny powoduje deficyty w zachowaniu dorosłego potomstwa, wyrażone niechęcią do picia wody słodkiej (anhedonia), obecnością zachowań lękowych (test podniesionego labiryntu krzyżowego) oraz wydłużonym czasem bezruchu przy jednoczesnym skróceniu czasu pływania oraz wspinania (test Porsolta). 21-dniowe podania leków przeciwdepresyjnych wywierały normalizujący wpływ na zmiany opisane w teście Porsolta, co stanowi o pozytywnej farmakologicznej weryfikacji tego modelu.

Oprócz badań behawioralnych u dorosłego potomstwa przeprowadzono badania biochemiczne metodami: real time PCR, ELISA oraz Western blot, wykorzystując homogenaty struktur mózgu szczególnie zaangażowanych w patogenezę depresji (hipokampa oraz kory czołowej).

W oparciu o wyniki *in vivo* stwierdzono, że leki przeciwdepresyjne: tianeptyna, wenlafaksyna oraz fluoksetyna wykazują zależne od struktury mózgu, silniejsze w hipokampie niż w korze czołowej, działanie immunomodulacyjne, w tym normalizują zaburzenia wywołane stresem prenatalnym w układach białek CX3CL1-CX3CR1, CXCL12-CXCR4/CXCR7 i CCL2-CCR2, a także obniżają poziom cytokin prozapalnych. Obserwacje te wskazują na potencjał homeostatyczny oraz przeciwzapalny badanych leków przeciwdepresyjnych w ośrodkowym układzie nerwowym.

Należy jednak zaznaczyć, że działanie leków na badane układy białek było zróżnicowane. Stwierdzono, że wszystkie leki przeciwdepresyjne normalizują poziom CXCL12, a wielokrotne podania fluoksetyny także zaburzona przez stres równowagę w poziomach receptorów tej chemokiny, co wskazuje na szczególny udział tego leku w modulacji układu białek CXCL12-CXCR4/CXCR7.

Natomiast w przypadku układu CX3CL1-CX3CR1 najsilniejsze działanie zaobserwowano po 21-dniowych podaniach tianeptyny, która podwyższała obniżony w wyniku stresu poziom CX3CL1 oraz normalizowała ekspresję CX3CR1. Badając mechanizm zaobserwowanego działania tianeptyny wykazano, że lek ten wywiera stymulujący wpływ na syntezę TGF β oraz kanoniczną ścieżkę tej cytokiny, w tym receptory TGF β r2, TGF β r1 w korze czołowej, a białko inhibitorowe Smad7 w hipokampie, a więc jej korzystne działanie związane jest nie tylko z normalizacją homeostatycznego układu CX3CL1-CX3CR1, ale także z indukcją syntezy cytokiny przeciwzapalnej. Istotny potencjał modulujący i przeciwzapalny tianeptyny potwierdził także jej wpływ na normalizację układu CCL2-CCR2, którego aktywacja nasila procesy chemotaksji w mózgu.

Ciekawe wyniki uzyskano także badając mechanizm hamującego działania wszystkich leków przeciwdepresyjnych na podwyższony w wyniku stresu prenatalnego poziom cytokin prozapalnych (IL-1 β IL-18) wykazując, że jest on związany z hamowaniem nadmiernej aktywacji kompleksu inflammasomu NLRP3.

Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania wykazały, że wywołane stresem prenatalnym zmiany w podłożu neuroimmunologicznym, wyrażone jako zaburzenia w układach chemokin i ich receptorów CX3CL1-CXCCR1, CXCL12-CXCR4/CXCR7, CCL2-CCR2 oraz w poziomach cytokin prozapalnych, normalizowane są przez wielokrotne podania leków przeciwdepresyjnych. Wydaje się zatem, że korzystne działanie leków na układy chemokin i ich receptorów, a tym samym na wzmocnienie endogennej regulacji komponenty immunologicznej mózgu, sugerować może przydatność modulatorów tych układów w terapiach łączonych z lekami przeciwdepresyjnymi.

8. SUMMARY

Depression is a group of affective disorders, etiopathogenesis of which has been explained only partially. Current theories underline the significance of the distorted interaction between the nervous, hormonal and immune systems in pathomechanisms of depression. Especially dysfunction in chemokine-chemokine receptor protein systems has recently become a focus of increasing interest as a potential basis of development of depressive disorders. These proteins modulate nervous system cell functions, control neurodevelopmental processes and neurotransmission, mediate crosstalk between neurons and glial cells and play a key role in the regulation of brain homeostatic processes. In spite of so significant rationales, to date, only a few studies have investigated the contribution of chemokines and their receptors to the mechanism of action of antidepressant drugs.

Therefore, the aim of the studies presented in this thesis was to determine the effect and potential mechanisms of action of antidepressant drugs belonging to different groups (tianeptine, venlafaxine and fluoxetine) on the chosen chemokine-chemokine receptor systems in *in vitro* organotypic hippocampal cultures, and then their *in vivo* verification in brain structures particularly engaged in pathophysiology of depression (frontal cortex and hippocampus) in adult 3 months old offspring.

All studies presented in this thesis were conducted in parallel in the control and experimental system in the prenatal stress model of depression. Pregnant Sprague-Dawley rats were exposed to stress induced by immobilization and strong light (three times a day, 45 min each) from 14th the day of pregnancy till parturition. From among antidepressant drugs, venlafaxine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor and tianeptine, an atypical drug were chosen for *in vitro* studies, while *in vivo* studies included also fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor.

Organotypic hippocampal cultures were chosen for the present studies because they are useful for analysis of not only relationships between the nervous, endocrine and immune systems, but also physiological interactions between brain cells as their functional connections are preserved in this experimental system. Using this model, it was shown that prenatal stress distorted chemokine – chemokine receptor systems and increased proinflammatory cytokine synthesis (IL-1 β , IL-18), when investigated in hippocampal cultures established from 6-7-days old offspring. Exposure to stress during pregnancy also

increased the sensitivity of the hippocampus to stimulation by bacterial endotoxin (LPS). The presented studies indicated a normalizing action of tianeptine and venlafaxine on the following ligand-receptor systems: CX3CL1-CX3CR1, CXCL12-CXCR4/CXCR7 and CCL2-CCR2 which may suggest a significant role of these systems not only in pathomechanisms of stress but also in the mechanisms of action of antidepressant drugs.

The second part of the thesis describes studies in 3 months old males in which behavioral verification of the experimental model was performed. It was confirmed that prenatal stress-induced behavioral deficits in adult offspring expressed as a reduced preference for drinking sweet water (anhedonia), anxiety behavior in the elevated plus maze test and increased immobility time and shortened swimming and climbing time in the Porsolt test. Twenty-one-day administration of antidepressant drugs had a normalizing effect on the changes manifested in the Porsolt test which provides a positive pharmacological verification of the model.

In addition to behavioral studies, biochemical analyses were also carried out in adult offspring, including real-time PCR, ELISA and Western blot using homogenates of the brain structures particularly involved in the pathogenesis of depression (hippocampus and frontal cortex).

Based on *in vivo* results, it was found that antidepressant drugs: tianeptine, venlafaxine and fluoxetine produced brain structure-dependent (stronger in the hippocampus than in the frontal cortex) immunomodulating action, including normalization of disturbances elicited by prenatal stress in the protein systems CX3CL1-CX3CR1, CXCL12-CXCR4/CXCR7 and CCL2-CCR2, and also reduced proinflammatory cytokine levels. These observations indicate the homeostatic and anti-inflammatory potential of these drugs in the central nervous system.

However, it should be underlined that the action of the drugs on these protein systems was diverse. All antidepressant drugs normalized CXCL12 level while repeated fluoxetine treatment normalized also stress-induced displacement of balance between receptors of this chemokine which indicates a particular contribution of this drug to modulation of the proteins CXCL12-CXCR4/CXCR7.

On the other hand, the strongest action on CX3CL1-CX3CR1 was observed after the 21-day administration of tianeptine which increased CX3CL1-CX3CR1 level reduced by prior stress exposure and normalized CX3CR1 expression. Investigation of the mechanism of

this tianeptine's action showed that it stimulated TGF β synthesis and canonical pathway of this cytokine, including TGF β r2, TGF β r1 receptors in the frontal cortex and the inhibitory protein Smad7 in the hippocampus. Thus, its beneficial action was connected not only with normalization of the homeostatic CX3CL1-CX3CR1 system but also with induction of proinflammatory cytokine synthesis. A significant modulating and anti-inflammatory potential of tianeptine was also confirmed by its normalizing effect on the CCL2-CCR2 system the activation of which enhances chemotactic processes in the brain.

Interesting results were obtained with the investigation of the suppressive mechanism of action of all antidepressant drugs on the prenatal stress-induced elevation of proinflammatory cytokine levels (IL-1 β , IL-18), namely, it was shown to be linked with the inhibition of excessive activation of NLRP3 inflammasome complex.

The studies conducted within of frame this doctoral thesis demonstrated that prenatal stress-induced changes in the neuroimmune base, expressed as disturbances in chemokine-chemokine receptor systems: CX3CL1-CXCCR1, CXCL12-CXCR4/CXCR7, CCL2-CCR2 and proinflammatory cytokine levels, were normalized by repeated treatment with antidepressant drugs. Therefore, it appears that beneficial action of these drugs on chemokines and their receptors, and thus strengthening of endogenous regulation of the immune component in the brain can suggest the usefulness of modulators of these systems in combination therapies with antidepressant drugs.