

Anna Kurek

Tytuł: „Rola glikokortykoidów w regulacji procesów neurodegeneracyjnych, w hodowlach organotypowych hipokampa.”

Promotor: **Prof. dr hab. B. Budziszewska**

Streszczenie

Glikokortykoidy łatwo przechodzą przez barierę krew-mózg i wiążąc się z wewnątrzkomórkowymi receptorami dla glikokortykoidów (GR) i mineralokortykoidów (MR) regulują funkcje i przeżywalność komórek ośrodkowego układu nerwowego. Hormony te są niezbędne do utrzymania homeostazy oraz adaptacji organizmu do warunków stresowych, jednak ich długotrwałe, nadmierne wydzielanie prowadzi do uszkodzenia różnych struktur mózgu, a zwłaszcza hipokampa. Hipokamp odgrywa istotną rolę w procesach uczenia się i pamięci i jest strukturą szczególnie wrażliwą na działanie czynników neurotoksycznych. Przedłużający się stres lub długotrwałe podawanie glikokortykoidów *in vivo* powoduje utratę neuronów w hipokampie (zwłaszcza w regionie CA3), reorganizację dendrytów wierzchołkowych pola CA3, zmniejszenie liczby rozgałęzień i gęstość synaps oraz hamuje neurogenezę. Mechanizm neurotoksycznego działania glikokortykoidów jest jednak słabo poznany.

W przeciwieństwie do badań *in vivo*, większość eksperymentów *in vitro* nie przyniosło jednoznacznych rezultatów wskazujących na neurotoksyczny potencjał glikokortykoidów. Dotychczasowe dane wykazują, że bardziej podatne na neurotoksyczne działanie kortykosteronu są mieszane hodowle neuronalno-glejowe niż hodowle samych neuronów. Wydaje się więc, że brak połączeń i oddziaływania pomiędzy różnymi rodzajami komórek układu nerwowego może być przyczyną słabego cytotoksycznego działania glikokortykosteroidów w badaniach *in vitro*. Dotychczas przeprowadzono zaledwie kilka badań z wykorzystaniem hodowli organotypowych hipokampa, jednak określano działanie kortykosteronu wyłącznie w tkance pochodzącej od zwierząt kontrolnych, podczas gdy wiadomo, że efekty działania glikokortykoidów u dorosłych zwierząt w dużej mierze zależą od czynników działających na organizm w okresie okołourodzeniowym.

Celem obecnej pracy była ocena potencjalnego cytotoksycznego działania kortykosteronu i jego interakcji z glutaminianem w organotypowych hodowlach hipokampa uzyskanych od zwierząt poddawanych procedurze stresu prenatalnego (zwierzęcy model depresji). Hodowle organotypowe zawierają wszystkie typy komórek układu nerwowego i ich naturalne połączenia, a więc jest to model *in vitro* najbardziej zbliżony do warunków *in vivo*. Ponieważ uszkodzające działanie kortykosteronu na komórki hipokampa może zależeć od poziomu GR i MR dlatego badano ich stężenie. Wiele danych wskazuje na hamowanie przez kortykosteron poziomu czynników wzrostu, dlatego badano stężenie BDNF, NGF oraz ich receptorów. Glikokortykoidy mogą wpływać na aktywację komórek mikrogleju i zwiększać syntezę cytokin prozapalnych, dlatego oznaczano poziom czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) uszkodzającego komórki oraz IL-1 β . Ponieważ TNF- α może regulować różne ścieżki przekazywania sygnału: może aktywować kaspazę-1, a co za tym idzie IL-1 β , działać ochronnie - zwiększając syntezę NF- κ B i Bcl2 oraz wprowadzać komórki na ścieżkę apoptozy poprzez aktywację kaspazy-8, dlatego określono główne markery tych szlaków.

W przeprowadzonych badaniach skupiono się na zbadaniu różnic w działaniu różnych stężeń kortykosteronu, glutaminianu i ich łącznej aplikacji na markery procesu nekrozy i apoptozy w hodowlach organotypowych zakładanych od zwierząt kontrolnych oraz zwierząt poddawanych stresowi w okresie prenatalnym. Badane związki dodawano do pożywki hodowlanej na 24 i/lub 72 godziny.

Uzyskane wyniki wykazały, że kortykosteron w stężeniach odpowiadających jego poziomowi w stresie nasila tylko proces apoptozy, natomiast działanie nekrotyczne wywołuje w stężeniach ponadfizjologicznych. Stwierdzono także, że stres w okresie prenatalnym zwiększa podatność na uszkodzenia tkanki hipokampa indukowane kortykosteronem i glutaminianem w późniejszym okresie. Jednym z mechanizmów pro-apoptotycznego działania kortykosteronu w hipokampach zwierząt poddawanych prenatalnemu stresowi jest stymulacja syntezy prozapalnych cytokin TNF- α i IL-1 β oraz obniżenie poziomu anty-apoptotycznego białka Bcl-2. W przeciwieństwie do niektórych danych literaturowych niniejsze badania nie potwierdziły nasilania przez kortykosteron uszkodzającego działania glutaminianu ani istotnego hamowania przez ten steroid syntezy czynników wzrostu. Przeprowadzone badania wykazały, że podniesiony poziom kortykosteronu odgrywa istotną rolę w indukowaniu uszkodzeń hipokampa, a jego działanie

jest nasilane przez czynniki stresowe działające w okresie prenatalnym, jednak obserwowano też zmiany świadczące o uruchomieniu przez procedurę stresu prenatalnego mechanizmów ochronnych.

Nie można więc jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy stres w okresie prenatalnym jedynie uwrażliwia komórki hipokampa na czynniki uszkodzające, działające w późniejszym okresie, czy może także działać w niektórych przypadkach jako czynnik hartujący. Podobnie jak w przypadku stresu prenatalnego, również nie wszystkie zmiany indukowane kortykosteronem można interpretować jako niekorzystne, nasilające procesy degeneracji.

Podsumowując, niniejsze badania wykazały, że wpływ kortykosteronu na żywotność komórek hipokampa zależy nie tylko od stężenia tego hormonu i czasu jego działania, ale również od tego, czy zwierzęta były narażone na bodźce stresowe w okresie prenatalnym, jednak nie wszystkie zmiany indukowane kortykosteronem czy stresem prenatalnym można interpretować jako niekorzystne.

Summary

Glucocorticoids easily pass through the blood-brain barrier, and by binding to intracellular mineralocorticoid and glucocorticoid receptors (MR and GR, respectively), they exert several actions on the central nervous system cells.

Glucocorticosteroids are necessary for maintaining homeostasis and facilitate the adaptation of the organism to stress conditions, but their prolonged and excessive secretion leads to damage in various brain structures (notably the hippocampus). The hippocampus plays a major role in learning and memory, and is the most vulnerable to neurotoxic factors brain's structure. It has been proven that prolonged stress or long-term application of glucocorticoids causes loss of hippocampal neurons (especially in the CA3 region), CA3 apical dendrite reorganisation, simultaneously reducing branching, synapse density, and neurogenesis.

The mechanisms of glucocorticoid toxicity have not been researched extensively. Contrary to *in vivo* studies, most *in vitro* experiments have not yielded clear results which would indicate the neurotoxic potential of glucocorticoids. Most recent research results have shown mixed (neural-glial) cultures to be more susceptible than exclusively neuron-based cultures. Hence, as can be observed in *in vitro* studies, the lack of connections and interactions between various types of nervous cells seems to limit neurotoxicity. The research to date (on hippocampal organotypic cultures) has only determined corticosterone action in control animal tissue – while it is known that glucocorticoid effects in adult animals hinge largely on factors at work in the perinatal period.

The goal of the current study was to assess the potential cytotoxic effect of corticosterone and its interactions with glutamate in hippocampal organotypic cultures obtained from animals subjected to prenatal stress (animal depression model). Organotypic cultures contain all types of nervous system cells as well as their natural connections and as such, it is the *in vitro* model the most similar to *in vivo* conditions. The damaging influence of corticosterone on hippocampal cells may be dependent on the level of GR and MR. Therefore, the concentration of these receptors was tested. Much data indicates that corticosterone reduces levels of growth factor, which is why BDNF, NGF and their receptors were tested. Glucocorticoids may affect the activation of microglia cells and increase the synthesis of proinflammatory cytokines, hence, the level of tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) was determined. TNF- α can activate different signaling pathways. It can induce inflammation (by increasing the amount of caspase-1, and subsequently IL-1 β), protect (by increasing the synthesis of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B) and B-cell lymphoma 2 proteins (Bcl-2), and introduce cells to the apoptosis pathway (via increasing the caspase-8 level). Therefore, the level of these factors was also determined.

The scope of this thesis was to focus on examining the differences between various concentrations of corticosterone, glutamate, and both corticosterone and glutamate simultaneously; and their influence on necrosis and apoptosis markers in organotypic cultures obtained from the control and prenatally stressed animals. The examined compounds were added to culture media for 24 and 72 hours.

The results indicate that corticosterone in stress-like concentrations increases only apoptosis (necrotic influence was only observed in superphysiological concentrations). The

research showed that prenatal stress increased susceptibility to hippocampal tissue damage which was influenced directly by corticosterone and glutamate. One of the pro-apoptotic actions of corticosterone in the hippocampi of prenatally stressed animals is the stimulation of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β and reducing the level of anti-apoptotic Bcl-2 protein. Contrary to some data found in the literature, the current research did not confirm that corticosterone increases the damage caused by glutamate or significantly inhibits growth factor synthesis. However, it indicated that stress-elevated corticosterone played a significant role in inducing hippocampal lesions, and that its effect was enhanced by prenatal stressors. At the same time, protective mechanisms caused by the prenatal stress were observed.

Because the presented results have shown both protective and degenerative effects, it was not possible to answer unequivocally the question whether prenatal stress sensitizes hippocampal cells to damaging factors that are later affected, or act as a protective factor. As with prenatal stress, not all corticosterone-induced changes can be interpreted as adverse, enhancing degeneration processes.

In summary, this study showed that the effect of corticosterone on the viability of the hippocampus cells depends not only on the concentration and duration of action of this hormone, but also whether the animals are exposed to prenatal stress. However, not all changes induced by corticosterone or prenatal stress can be interpreted as adverse.