

mgr Natalia Bryniarska-Kubiak

Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Katedra Neurologii Wydziału Lekarskiego

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Promotor I: **prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim**

Promotor II: **prof. dr hab. Joanna Pera**

Tytuł pracy doktorskiej:

***Ocena udziału mechanizmów neuroimmunologicznych
w procesach niedokrwienia mózgu***

*Assessment of the role of neuroimmunological mechanisms
in the processes of cerebral ischemia*

STRESZCZENIE

Udar mózgu stanowi drugą, po chorobach układu krążenia, najczęstszą przyczynę zgonów na świecie. Około 85% wszystkich udarów stanowi udar niedokrwienno, którego mechanizmy molekularne nadal nie zostały w pełni poznane. Ostatnio wskazuje się na udział mechanizmów neuroimmunologicznych w przebiegu tego schorzenia, zwracając uwagę szczególnie na chemokiny i ich receptory. Wykazano, że białka te modulować mogą aktywność komórek układu nerwowego, pośredniczyć w komunikacji neuron-glej i mieć istotne znaczenie w przebiegu procesów zapalnych oraz regulacji homeostazy.

Dlatego ogólnym celem niniejszej rozprawy była ocena udziału chemokin i/lub receptorów chemokin w patofizjologii niedokrwienia mózgu. Badania przeprowadzono w modelu *ex vivo* z wykorzystaniem hodowli organotypowych hipokampa (ang. *organotypic hippocampal culture* - OHC) zakładanych od 6-7-dniowego potomstwa szczurów Sprague-Dawley.

Warto zaznaczyć, że w modelu OHC zachowana jest struktura hipokampa, zależności pomiędzy układem nerwowym i immunoendokrynnym, a także funkcjonalne interakcje pomiędzy poszczególnymi komórkami. Jako model udaru niedokrwienego zastosowano procedurę deprywacji tlenu i glukozy (ang. *oxygen-glucose deprivation* - OGD). Do badań wybrano trzy należące do różnych podrodzin chemokiny: CX3CL1, CXCL12 i CCL2 oraz odpowiednio ich receptory CX3CR1, CXCR4 i CCR2. Modulację tych receptorów wykonano z użyciem odpowiednich antagonistów - związków: AZD8797, AMD3100 oraz Irbesartanu. Co więcej, podjęto także próbę wyjaśnienia molekularnych mechanizmów niektórych zaobserwowanych zmian neuroimmunologicznych i biomechanicznych. Wszystkie zaprezentowane w pracy wyniki badań kolorymetrycznych, biochemicznych, immunofluorescencyjnych oraz biomechanicznych uzyskano prowadząc doświadczenia porównawczo w hodowlach kontrolnych i poddanych OGD.

W pierwszej części pracy przeprowadzono weryfikację modelu OGD. Wykazano, że procedura OGD wywiera działanie cytotoksyczne, a także zwiększa poziom HIF-1 α – markera hipoksji w OHC. Z zastosowaniem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej pokazano, że największe uszkodzenie w modelu OGD dotyczyło regionu CA1 hipokampa. Co więcej, procedura OGD prowadziła do zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego oraz do depolimeryzacji mikrotubul, a także tworzenia się agregatów tubuliny w OHC. Jednocześnie wykorzystując mikroskopię sił atomowych działającą w trybie spektroskopii sił pokazano istotny wzrost sztywności OHC w modelu OGD. Najnowsze doniesienia naukowe wskazują na obecność potencjalnych zależności pomiędzy biomechaniką (sztywnością tkanek) oraz procesami zapalnymi. Oznaczenia poziomu głównych mediatorów tego procesu wykazały, że OGD istotnie nasila syntezę czynników prozapalnych w tym cytokin (IL-6, IL-18, TNF- α) oraz chemokin (CCL3, CCL5 oraz CXCL10) przy jednoczesnym spadku produkcji cytokiny przeciwzapalnej IL-10.

W kolejnym etapie doświadczeń skupiono się na ocenie wpływu OGD na poziom wspomnianych wcześniej układów chemokin i ich receptorów. W przypadku białek CX3CL1-CX3CR1 nie wykazano wpływu OGD na poziom endogennej CX3CL1 oraz brak efektu egzogennej podania tego liganda na ilość uwolnionego LDH. Co ciekawe, związek AZD8797, antagonistą receptora CX3CR1, osłabiał efekt cytotoksyczny wywołany przez OGD. Obserwacja ta była przesłanką do badań, w których wykorzystano hodowle z „wyciszonym” mikroglejem. Uzyskane wyniki wskazują, że eliminacja tych komórek z OHC

nasila cytotoksyczność w modelu OGD oraz moduluje profil sekrecji cytokin pro- i przeciwzapalnych.

Oceniano także wpływ procedury OGD na układ CXCL12-CXCR4. Pokazano zwiększenie ekspresji białka CXCL12 w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Jednocześnie zaobserwowano, że związek AMD3100, który jest antagonistą receptora CXCR4 istotnie zwiększa cytotoksyczność oraz nasila syntezę cytokiny prozapalnej (IL-18) w OHC po procedurze OGD.

Ciekawych wyników dostarczyły także badania dotyczące oceny udziału białek CCL2-CCR2 w modelu OGD. Stwierdzono, że w modelu tym dochodzi do wzrostu ekspresji białka CCL2. Równocześnie pokazano, iż Irbesartan – antagonistą receptora CCR2 - zmniejsza istotnie uwalnianie LDH po OGD oraz wywiera silne działanie przeciwzapalne hamując syntezę cytokin (IL-6, IL-1 β) oraz chemokin prozapalnych (CCL3, CCL5, CXCL10). W kolejnym etapie przeprowadzonych badań wykazano, że ochronne i przeciwzapalne działanie Irbesartanu mediowane jest przez aktywację czynnika transkrypcyjnego PPAR γ , gdyż antagonistą tego białka (związek GW9662) osłabia korzystny profil działania Irbesartanu w modelu OGD. Co istotne, przeprowadzone z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych doświadczenia dostarczyły dowodów, że przeciwzapalnemu działaniu Irbesartanu towarzyszy zmiana biomechaniki OHC, ponieważ Irbesartan osłabiał zmiany sztywności hodowli w modelu OGD.

W drugiej części niniejszej pracy zaprezentowano wyniki analiz oraz badań biochemicznych przeprowadzonych u pacjentów z ostrym udarem niedokrwiennym. Przedstawiono analizę obrazów z tomografii komputerowej oraz danych z wywiadu lekarskiego. Informacje te pozwoliły między innymi na ocenę danych demograficznych (wiek, płeć) oraz czynników ryzyka, w tym chorób współwystępujących. Jednocześnie zaprezentowano wynik badań, które objęły określenie stężenia chemokin CXCL12 oraz CCR2 w osoczu pacjentów. Chociaż uzyskane wyniki nie wykazały różnic w stężeniu CXCL12 oraz CCL2 z udarem niedokrwiennym w porównaniu do wartości stężeń u osób z grupy kontrolnej, to wykonane oznaczenia wskazały na tendencję do wzrostu stężeń tych chemokin u pacjentów z umiarkowanym i/lub ciężkim przebiegiem zachorowania, które oceniono w oparciu o skalę NIHSS.

Podsumowując, w niniejszej pracy pokazano, że zastosowanie modelu deprivacji tlenu i glukozy w hodowlach organotypowych hipokampa pozwala na badanie neuroimmunologicznych mechanizmów udaru niedokrwionego mózgu ze szczególnym uwzględnieniem chemokin i ich receptorów. Jednocześnie należy podkreślić, że w modelu OGD obserwowano nie tylko istotne deficyty w obrębie komponenty immunologicznej, ale również zmiany w architekturze cytoszkieletu oraz zaburzenia biomechaniczne. W oparciu o uzyskane wyniki można postulować, że modulacja niektórych układów chemokina - receptor chemokiny, w tym głównie CCL2-CCR2, ma w zastosowanym modelu działanie ochronne, co daje podstawy do zwrócenia uwagi na tą strategię jako przydatne narzędzie w potencjalnej terapii udaru niedokrwionego.

ABSTRACT

Stroke is the second most common cause of death in the world after cardiovascular disease. About 85% of all strokes are ischemic, the molecular mechanisms of which are still not fully understood. Recently, the involvement of neuroimmune mechanisms in the course of this disease has been indicated, with a particular interest in chemokine and its receptors. It has been shown that these proteins can modulate the activity of nervous system cells, mediate neuronal-glial communication and be important in the course of inflammatory processes and the regulation of homeostasis.

Therefore, the overall aim of this dissertation was to evaluate the contribution of chemokines and/or chemokine receptors to the pathophysiology of cerebral ischemia. The studies were carried out in an *ex vivo* model using organotypic hippocampal culture (OHC) established from 6-7 days old offspring of Sprague-Dawley rats. It should be emphasized that the OHC model preserves the structure of the hippocampus, the relationships between the nervous and immunoendocrine systems, and functional interactions between individual cells. The oxygen-glucose deprivation (OGD) procedure was used as a model of ischemia. Three chemokines belonging to different subfamilies were selected for the study: CX3CL1, CXCL12, and CCL2, and their receptors CX3CR1, CXCR4, and CCR2, respectively. Modulation of these receptors was performed with the use of appropriate antagonists: AZD8797, AMD3100, and Irbesartan. Moreover, an attempt was made to elucidate the molecular mechanisms behind the observed neuroimmune and biomechanical changes. All the results of colorimetric, biochemical, immunofluorescence, and biomechanical tests presented in the study were obtained by conducting comparative experiments in control and OGD cultures.

In the first part of the work, the OGD model was verified. The OGD procedure has been shown to exert a cytotoxic effect and also increases the level of HIF-1 α - a marker of hypoxia. Using confocal fluorescence microscopy, it was shown that the most robust damage in the OGD model was localized in the CA1 region of the hippocampus. Moreover, the OGD procedure led to changes in the organization of the actin cytoskeleton and the depolymerization of microtubules followed by the formation of tubulin aggregates in OHC.

At the same time, atomic force microscopy operating in the force spectroscopy mode was applied to investigate the mechanical properties of OHCs. OGD was shown to induce significant stiffening of OHCs. The latest scientific reports indicate the presence of relationships between biomechanics (tissue stiffness) and inflammatory processes.

Measurements of the level of the important inflammation mediators showed that OGD significantly enhances the synthesis of pro-inflammatory factors, including cytokines (IL-6, IL-18, TNF- α) and chemokines (CCL3, CCL5, and CXCL10) with a simultaneous decrease in the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10.

The next stage of the experiments was focused on the assessment of the effect of OGD on the role of chemokines and their receptors in the neuroinflammation process induced by OGD in OHC. In the case of the CX3CL1-CX3CR1 system, no effect of OGD on the level of endogenous CX3CL1 was observed. Also, exogenous administration of CX3CL1 did not affect the amount of LDH released after OGD. Interestingly, AZD8797, an antagonist of the CX3CR1, attenuated the cytotoxic effect induced by OGD. This observation was the basis for the research in which cultures with "silenced" microglia were used. The obtained results indicate that the elimination of microglia cells from OHC enhances the cytotoxicity induced in the OGD model and modulates the pro-and anti-inflammatory cytokine secretion profile.

The effect of the OGD procedure on the CXCL12-CXCR4 system was also assessed. The increase in expression of the CXCL12 protein was shown in OHC after OGD. At the same time, it was observed that the compound AMD3100, which is an antagonist of the CXCR4 receptor, significantly increases the cytotoxicity and enhances the synthesis of the pro-inflammatory cytokine (IL-18) in the OHC after the OGD procedure.

Interesting results were also provided by studies on the assessment of the role of the CCL2-CCR2 system in the OGD model. It was found that the expression of the CCL2 was increased after OGD. At the same time, it was shown that the use of Irbesartan - a CCR2 antagonist - significantly reduced the release of LDH after OGD and had a strong anti-inflammatory effect by decreasing the synthesis of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β) and chemokines (CCL3, CCL5, CXCL10). In the next stage of the study, it was shown that the protective and anti-inflammatory effect of Irbesartan was mediated by the activation of the PPAR γ transcription factor.

The antagonist of PPAR γ – GW9662 reduced the protective effect of Irbesartan in the OGD model. Importantly, experiments carried out using atomic force microscopy provided evidence that the anti-inflammatory effect of Irbesartan was accompanied by a change in OHC biomechanics since Irbesartan limited changes in culture stiffness in the OGD model.

The second part of this dissertation presents the results of analyzes and biochemical tests carried out in patients with acute ischemic stroke. The analysis of computed tomography images and data from the medical interview were presented. This information allowed to assessment demographic data (age, gender) and risk factors, including comorbidities. Moreover, the determination of the concentration of CXCL12 and CCL2 chemokines in the plasma of patients was performed. Although the obtained results did not show differences in the concentration of CXCL12 and CCL2 in the plasma of patients with ischemic stroke compared to the values of the concentrations in the control group, the tests performed showed a tendency to increase the concentrations of these chemokines in patients with moderate and/or severe disease, which were assessed based on the NIHSS scale.

In conclusion, this study shows that the use of the oxygen and glucose deprivation model in hippocampal organotypic cultures allows for the study of neuroimmune mechanisms of ischemic stroke, with particular emphasis on chemokines and their receptors. At the same time, it should be emphasized that in the OGD model, not only significant deficits in the immune component were observed, but also changes in the architecture of the cytoskeleton and biomechanical disorders. Based on the results obtained, it can be postulated that modulation of some chemokine-chemokine receptor systems, mainly CCL2-CCR2, has a protective effect in the model used, which gives grounds to consider this strategy as a useful tool in the potential therapy of ischemic stroke.