

STRESZCZENIE

Patogeneza depresji od lat stanowi przedmiot licznych badań, jednakże niejednorodny obraz kliniczny nastęca trudności z wyjaśnieniem podłoża tego schorzenia. W ostatnich latach podkreśla się istotne znaczenie czynników stresowych w powstawaniu epizodów depresyjnych, szczególnie rolę stresu w okresie okołourodzeniowym, który zaburza interakcje pomiędzy układami neuroendokrynnym, a odpornościowym. W konsekwencji obserwuje się dysfunkcje układu odpornościowego oraz nasilenie procesów zapalnych, nie tylko na obwodzie, ale przede wszystkim w ośrodkowym układzie nerwowym.

Nowe spojrzenie na regulację tych procesów przyniosły ostatnie lata, podkreślając znaczenie białek chemotaktycznych - chemokin oraz ich receptorów w wewnętrznej kontroli mechanizmów immunoaktywacji. W mózgu wśród chemokin szczególne zainteresowanie budzą te, które posiadają silne właściwości chemotaktyczne i/lub uczestniczą w regulacji procesów migracji, proliferacji, synaptogenezy, tworzenia sieci neuronalnych oraz komunikacji pomiędzy komórkami neuronalnymi oraz mikroglejem.

Przedmiotem badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej była ocena roli wybranych chemokin - fraktalkiny (CX3CL1) oraz CCL2/MCP1 (ang. *monocyte chemoattractant protein*) i ich receptorów w neuroimmunologicznym podłożu zaburzeń depresyjnych.

W pracach wykorzystano dwa uznane i opisane w literaturze modele doświadczalne: zwierzęcy model depresji oparty na procedurze stresu prenatalnego oraz model stymulacji endotoksyną bakteryjną - lipopolisacharydem (LPS), czyli immunoaktywacji. W pierwszym z tych modeli prowadzono badania na dwóch płaszczyznach *in vitro* oraz *in vivo*, natomiast stymulację LPS-em wykorzystano jedynie do badań prowadzonych w korowych hodowlach pierwotnych mikrogleju.

Przydatność modelu stresu prenatalnego do badań patogenezy depresji potwierdziła jego weryfikacja behawioralna, która pokazała u dorosłych 3-miesięcznych samców Sprague-Dawley (potomstwie matek stresowanych od 14 dnia ciąży do dnia porodu) obecność deficytów behawioralnych przypominających objawy depresji (w teście preferencji spożycia 1% roztworu cukru oraz wymuszonego pływania), lękowych (test podniesionego labiryntu krzyżowego), a także zmiany w aktywności eksploracyjnej w nowym środowisku.

Ponieważ dotychczasowe nasze badania sugerują, iż stres prenatalny prowadzi do dysfunkcji w obrębie układu odpornościowego, a w mózgu głównymi komórkami immunokompetentnymi są komórki mikrogleju, w badaniach *in vitro* wykorzystano korowe hodowle tych komórek, zakładane zarówno od 1-2 dniowych osesków kontrolnych jak i od potomstwa matek stresowanych w okresie ciąży. W prezentowanych badaniach wykazaliśmy, że stres prenatalny aktywuje komórki mikrogleju, prowadząc do zmian morfologicznych oraz biochemicznych, w tym nasilenia ekspresji markerów powierzchniowych: MHCII i CD40 oraz produkcji czynników prozapalnych: cytokin IL-1 β , TNF- α , IL-18, IL-6, chemokiny CCL2 oraz jej receptora CCR2, jak i tlenku azotu. Jednocześnie mikroglej od zwierząt stresowanych wykazywał ograniczoną produkcję insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1).

W prezentowanych pracach wykorzystany został także model immunoaktywacji wywołanej endotoksyną bakteryjną - lipopolisacharydem (LPS), który używany jest standardowo do badań roli aktywacji komórek mikrogleju oraz działania substancji immunomodulacyjnych, m.in. niektórych leków przeciwdepresyjnych. Uzyskane wyniki pokazały, że endotoksyna bakteryjna indukuje fenotyp M1 mikrogleju, w tym nasila ekspresję markerów: CD40 i MHCII, zwiększa uwalnianie cytokin prozapalnych IL-1 β , TNF- α , IL-18, IL-6 oraz chemokiny CCL2, a także syntezę tlenku azotu oraz ekspresję kluczowego enzymu związanego z jego produkcją indukowalnej syntazy tlenku azotu. Co więcej w zastosowanym modelu pokazano, że atypowy lek przeciwdepresyjny – tianeptyna wykazuje działanie immunomodulujące o potencjale przeciwzapalnym, a mechanizm jej działania w hodowlach stymulowanych LPS-em związany jest nie tylko z hamowaniem ekspresji receptora TLR4 i pobudzenia kinaz ERK1/2, ale także wpływem tego leku na hamowanie, mediowanej kaspazą-3, aktywacji kinazy PKC δ .

W kolejnym etapie badań *in vitro* oceniono rolę egzogennej fraktalkiny w modulacji aktywacji zapalnej w hodowlach zakładanych od zwierząt stresowanych prenatalnie. Pokazano, że fraktalkina obniża, podwyższoną przez stres prenatalny, sekrecję cytokin prozapalnych, chemokiny CCL2, jak również produkcję tlenku azotu, a więc hamuje fenotyp M1 mikrogleju. Działanie fraktalkiny normalizowało także poziom jej receptora - CX3CR1 zlokalizowanego na komórkach mikrogleju, a przeciwzapalne działanie tej chemokiny znosiło zastosowanie przeciwciała blokującego receptor CX3CR1.

Podsumowując, w badaniach przeprowadzonych w hodowlach pierwotnych mikrogleju pokazano, że zarówno stymulacja lipopolisacharydem, jak i stres prenatalny powodują aktywację komórek mikrogleju. Natomiast badane chemokiny, w tym szczególnie fraktalkina działając przez receptor CX3CR1, kontroluje przebieg procesów zapalnych w mózgu poprzez hamowanie aktywacji mikrogleju.

W pracach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej zawarto także wyniki badań *in vivo* prowadzonych w homogenatach kory czołowej oraz hipokampa w modelu stresu prenatalnego. Wykazano, że aktywacja zapalna u zwierząt stresowanych prenatalnie jest długotrwała, obecna w badanych strukturach mózgu zarówno u młodego 7-dniowego, jak i dorosłego 3-miesięcznego potomstwa szczurów. Jej przejawem był między innymi wzrost liczby komórek mikrogleju, ekspresji markerów CD40, CD68, C1q jak i syntezy cytokin o profilu prozapalnym, a równocześnie obniżenie poziomu fraktalkiny oraz jej receptora zarówno w hipokampie jak i korze czołowej.

Dalsze badania wykazały istotną rolę deficytów w poziomie fraktalkiny w dysfunkcjach behawioralnych, obserwowanych u dorosłego potomstwa matek stresowanych w ostatnim tygodniu ciąży. Co ciekawe, jednorazowe dokomorowe podanie egzogennej fraktalkiny normalizowało (w 7 dniu po jej podaniu) zaburzenia pro-depresyjne, lękowe oraz zmiany w aktywności eksploracyjnej w nowym środowisku, u dorosłych samców po stresie prenatalnym. Nasze wyniki pokazały także przeciwzapalne działanie podanej dokomorowo fraktalkiny, związane w korze czołowej z normalizacją produkcji IL-18, IL-1 β , TNF- α oraz CCL2, podczas gdy w hipokampie z obniżeniem poziomu jedynie IL-18. Istotną rolę w mechanizmach działania fraktalkiny w korze czołowej wydaje się odgrywać jej wpływ na inflamasom NLRP3.

Uzyskane w zaprezentowanym cyklu prac wyniki wskazują, na istotną rolę układu fraktalkina - receptor fraktalkiny w modulacji aktywności komórek mikrogleju, a tym samym procesów zapalnych. Długotrwałe zaburzenia tych mechanizmów mogą prowadzić do przedłużonej immunoaktywacji w OUN oraz stanowić podłoże deficytów behawioralnych wywołanych procedurą stresu prenatalnego.