

Mgr Ewa Trojan

Tytuł pracy: „Neuroimmunologiczne mechanizmy działania leków przeciwdepresyjnych. Badania w modelach *in vivo* i *in vitro*

Promotor: **Prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim**

Promotor pomocniczy: **Dr Grzegorz Kreiner**

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. Szczególnie 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 glijowymi 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 wychwyty 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 homeostaticzny 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 zaburzoną 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 2, TGF β 1 w korze czołowej, a białko inhibitorowe Smad7 w hipokampie, a więc jej korzystne działanie związane jest nie tylko z normalizacją homeostaticznego 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.