

mgr Katarzyna Anna Chamera
Pracownia Immunoendokrynologii
Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

Tytuł rozprawy doktorskiej:

“Evaluation of the role of the selected neuronal and microglial proteins in the pathogenesis of schizophrenia – studies in an animal model.”

„Ocena roli wybranych białek neuronalnych i mikroglejowych w patogenezie schizofrenii – badania w modelu zwierzęcym.”

Promotor:

prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim

Recenzenci:

dr hab. n. med. Zofia Danilczuk – Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

prof. dr hab. n. med. Jan Kowalski – Katedra i Zakład Genetyki Medycznej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Oddział w Sosnowcu

STRESZCZENIE:

Dwukierunkowa komunikacja między neuronami a mikroglejem ma fundamentalne znaczenie dla homeostazy i funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Kluczowymi systemami regulującymi te oddziaływania są pary ligand-receptor, a wśród nich CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1. Osie te zaangażowane są w endogenną kontrolę aktywacji mikrogleju poprzez modulację uwalniania cytokin, ale także plastyczność synaptyczną czy neurogenezę. Wydaje się zatem, że nieprawidłowe działanie układów CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1 może być istotne w rozwoju chorób psychicznych, w tym schizofrenii.

Sugeruje się, że duże znaczenie w powstawaniu zaburzeń schizofrenicznych odgrywa aktywacja układu immunologicznego matki (MIA) w okresie ciąży. Konsekwencjami MIA są między innymi długotrwała aktywacja komórek mikrogleju, nasilenie i przedłużenie procesów zapalnych, a następnie dysfunkcje aktywności i plastyczności synaps.

W oparciu o dane literaturowe, celem badań, opisanych w ramach niniejszej rozprawy, była weryfikacja hipotezy zakładającej, że MIA wpływa na układy CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1 w korze czołowej i hipokampie potomstwa, a także prowadzi do powstania deficytów behawioralnych, przypominających schizofrenię w dorosłości.

W pracy zastosowano dwa neurorozwojowe modele schizofrenii, uwzględniając różne czynniki immunostymulujące (lipopolisacharyd – LPS, kwas poliinozyloowo-policytydylowy – Poly I:C), wiek potomstwa (młode, dorosłe), jak również podłoże genetyczne zwierząt doświadczalnych (Wistar, Sprague-Dawley).

Zaobserwowano, że MIA zmienia ekspresję genów i poziomy białek neuronalno-mikroglejowych CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1 w korze czołowej i hipokampie młodego potomstwa szczurów szczepu Wistar. Jednocześnie wykazano nieprawidłową reaktywność mikrogleju, indukowaną MIA, w mózgach tych zwierząt. Wskazują na to zaburzenia ekspresji genów markerów mikrogleju (w tym *Cd40*, *Arg1* i *iNos*) oraz cytokin pro- (*Il-1 β* , *Tnf- α* , *Il-6*) i przeciwzapalnych (*Tgf- β* , *Il-10*), ale także białkowych poziomów tych czynników (np. IL-6, IL-4). Niejednorodny profil zmian, dotyczący zarówno układów CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1, jak i reaktywności mikrogleju sugeruje istotny wpływ rodzaju użytej substancji immunostymulującej w powstawaniu nieprawidłowości u młodego potomstwa.

Pokazano również, że w korze czołowej i hipokampie dorosłego potomstwa szczurów dochodzi do zaburzeń w systemach CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1. Zmiany w tych układach zależą zarówno od czynnika immunostymulującego, jak i szczepu szczurów. Jednocześnie MIA wywiera niekorzystny wpływ na reaktywność mikrogleju w mózgach dorosłego potomstwa szczurów szczepu Sprague-Dawley (w modelu z użyciem LPS), o czym świadczą nieprawidłowości w ekspresji markerów mikrogleju oraz cytokin pro- i przeciwzapalnych.

U dorosłego potomstwa obu badanych szczepów, które w okresie prenatalnym narażone było na MIA, zaobserwowano pojawienie się zaburzeń behawioralnych, przypominających schizofrenię. Zmiany te dotyczyły zachowań lękowych, interakcji socjalnych, aktywności eksploracyjnej oraz bramkowania sensomotorycznego. Szczególnie interesujące są dane pokazujące, że deficyty w bramkowaniu sensomotorycznym są zależne od wieku, a dodatkowo

u dorosłego potomstwa szczurów szczepu Sprague-Dawley (w modelu LPS) pozwalają na wyodrębnienie dwóch fenotypów („odpowiadającego” i „nieodpowiadającego”), różniących zachowanie tych zwierząt. W oparciu o te wyniki dokonano weryfikacji teorii „dwóch uderzeń” poprzez zastosowanie dodatkowego bodźca u dorosłego potomstwa szczurów szczepu Sprague-Dawley w modelu LPS. Wykazano, że stymulacja w dorosłości prowadzi do zmian na poziomie behawioralnym i biochemicznym, głównie u zwierząt „nieodpowiadających”. Szczególnie istotny okazał się jej wpływ na układ CD200-CD200R oraz mechanizmy go regulujące, co pozwala sądzić, że chociaż MIA nie zawsze bezpośrednio prowadzi do deficytów behawioralnych, to uwrażliwia potomstwo na działanie niekorzystnych czynników w życiu dorosłym.

Uzyskane i przedstawione w rozprawie wyniki sugerują, że brak prawidłowego funkcjonowania układów neuronalno-mikroglejowych CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1, a także towarzyszące im zmiany w reaktywności mikrogleju, obserwowane w istotnych dla patomechanizmów schizofrenii strukturach mózgu, wywołane działaniem MIA w okresie prenatalnym, mogą stanowić ważny element złożonego obrazu tego schorzenia.

SUMMARY:

Bidirectional communication between neurons and microglia is fundamental to homeostasis and the functioning of the central nervous system. The key axes regulating these interactions are ligand-receptor pairs, and among them, CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1. These dyads are involved in the endogenous control of microglial activation through the modulation of cytokine release, but also in synaptic plasticity and neurogenesis. Therefore, it seems that the malfunction of the CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1 systems may be important in the development of mental diseases, including schizophrenia.

It has been suggested that maternal immune activation (MIA) during pregnancy plays a significant role in the development of schizophrenic disorders. The consequences of MIA include long-term activation of microglia cells, intensification and prolongation of inflammatory processes, and then dysfunctions of synaptic activity and plasticity.

Based on the literature data, the research described in this thesis aimed to verify the hypothesis that MIA influences the CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1 axes in the frontal

cortex and hippocampus of the offspring, and also leads to behavioural deficits resembling schizophrenia in adulthood.

In the present study, two neurodevelopmental models of schizophrenia were used, taking into consideration various immunostimulating factors (lipopolysaccharide – LPS, polyinosinic:polycytidylic acid – Poly I:C), age of the offspring (young, adult), as well as the genetic background of the experimental animals (Wistar, Sprague-Dawley).

It was observed that MIA alters the gene expression and protein levels of the neuronal-microglial systems CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1 in the frontal cortex and hippocampus of young Wistar rats offspring. At the same time, abnormal microglia reactivity, induced by MIA, was demonstrated in the brains of these animals. This is indicated by disturbances in the gene expression of microglial markers (including *Cd40*, *Arg1* and *iNos*) along with pro- (*Il-1 β* , *Tnf- α* , *Il-6*) and anti-inflammatory (*Tgf- β* , *Il-10*) cytokines, as well as protein levels of these factors (e.g. IL-6, IL-4). The heterogeneous profile of changes concerning both the CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1 dyads and microglia reactivity suggests a significant impact of the type of immunostimulating substance used in the development of abnormalities in young offspring.

It has also been shown that the CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1 axes are disturbed in the frontal cortex and hippocampus of adult rat offspring. The changes in these systems depend on both the immunostimulating factor and the rat strain. At the same time, MIA has an adverse effect on microglia reactivity in the brains of adult offspring of Sprague-Dawley rats (in the LPS model), as evidenced by abnormalities in the expression of microglial markers as well as pro- and anti-inflammatory cytokines.

Behavioural disturbances resembling schizophrenia were observed in the adult offspring of both tested strains, exposed to MIA in the prenatal period. These changes concerned anxiety behaviour, social interactions, exploratory activity and sensorimotor gating. Of particular interest are the data showing that the deficits in sensorimotor gating are age-dependent, and additionally in adult offspring of Sprague-Dawley rats (in the LPS model), allow for the identification of two phenotypes ("responsive" and "non-responsive"), differentiating the behaviour of these animals. Based on these results, the "two-hit" hypothesis was verified by applying an additional stimulus to the adult offspring of Sprague-Dawley rats in the LPS model. It has been shown that stimulation in adulthood leads to changes at the behavioural and

biochemical levels, mainly in "non-responsive" animals. Its influence on the CD200-CD200R system and its regulating mechanisms turned out to be particularly important, which suggests that although MIA does not always directly lead to behavioural deficits, it sensitizes offspring to adverse factors in adulthood.

The results obtained and presented in the thesis suggest that the lack of proper functioning of the neuronal-microglial systems CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1, as well as the accompanying changes in microglial reactivity, observed in brain structures important for the pathomechanisms of schizophrenia, caused by MIA in the prenatal period, may form an important part of the complex picture of this condition.