

Mgr Kinga Tylek

Tytuł rozprawy doktorskiej:

**Ocena roli ligandów receptora ALX/FPR2 w wyciszaniu procesów zapalnych w  
ośrodkowym układzie nerwowym: badania w doświadczalnych modelach  
immunoaktywacji**

Promotor: prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim

Promotor pomocniczy: dr Ewa Trojan

### **Streszczenie**

Podłoże zmian prowadzących do rozwoju chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w dalszym pozostaje przedmiotem wielośrodkowych analiz. Szczególne miejsce w badaniach ostatnich lat zajmuje poznanie przebiegu procesu zapalnego w tym mechanizmów jego prawidłowego wygaszania (ang. *resolution of inflammation*, RoI). Krótkotrwała reakcja zapalna jest procesem korzystnym, pozwalającym na eliminację patogenów, zwalczenie infekcji, regenerację oraz szybki powrót do homeostazy. Natomiast długotrwały proces zapalny ma działanie niekorzystne, które determinowane jest między innymi przez dysfunkcję endogennych procesów kontrolujących wyciszenie ostrego procesu zapalnego.

Dlatego celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było określenie czy wzmocnienie RoI, poprzez zastosowanie nowych egzogennych ligandów receptora ALX/FPR2 o obiecujących właściwościach farmakokinetycznych oraz lepszej od endogennych ligandów, biodostępności może stanowić nową strategię ograniczającą proces zapalny. Badania prowadzono wieloetapowo, w warunkach *in vitro* hodowli pierwotnych mikrogleju, *ex vivo* hodowli organotypowych hipokampa, a następnie dokonano weryfikacji uzyskanych wyników w warunkach immunoaktywacji *in vivo* w wybranych strukturach mózgu. Zastosowano techniki kolorymetryczne, immunofluorescencyjne, służące do oceny ekspresji genów, poziomu całkowitych i ufosforylowanych form białek (Western blot, ELISA) oraz metody wyciszania komórek mikroglejowych (klodronat).

W pierwszej części rozprawy zaprezentowano badania przeprowadzone *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnych hodowli mikrogleju stymulowanych lipopolisacharydem (LPS; niespecyficznym immunoaktywatorem pochodzenia bakteryjnego) uzyskanych od 0-2



dniowego potomstwa szczurów Sprague-Dawley. Wyniki pokazały zależne od czasu działanie ochronne i przeciwzapalne wszystkich badanych agonistów receptora ALX/FPR2: lipoksyny A4 (LXA4), jej analogu AT-LXA4 (ang. *aspirin-triggered lipoxin A4*) oraz nowego, egzogenego liganda związku MR-39. Tym niemniej w przypadku związku MR-39 spektrum korzystnego działania było najszersze i najdłużej zaznaczone, bowiem obserwowane także po 24 godzinach od jego dodania do hodowli mikrogleju. Co istotne, wykazano także, że w mediowaniu korzystnych efektów nowego mocznikopochodnego związku MR-39 zaangażowane są analogiczne szlaki wewnątrzkomórkowego przekazu sygnału jak aktywowane po interakcji ligandów endogennych (LXA4, AT-LXA4) z receptorem ALX/FPR2 (w tym ERK1/2, kinaza p38, czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B).

W kolejnym etapie badania prowadzono w układzie *ex vivo* stosując hodowle organotypowe hipokampa (OHC). Model ten stanowi przydatne narzędzie do analiz nie tylko zależności pomiędzy układem nerwowym, immunologicznym oraz endokrynnym, ale umożliwia także analizę fizjologicznych interakcji między komórkami mózgu dzięki zachowaniu funkcjonalnych połączeń neuronalno-glejowych. Ma zatem kluczowe znaczenie dla oceny działania związków o wnioskowanym potencjale przeciwzapalnym i pro-wyciszeniowym w przebiegu procesów zapalnych (w tym indukowanych LPS). W modelu tym przeprowadzono analizę kolejnych uzyskanych od grupy badawczej z Uniwersytetu im. Aldo Moro w Bari (Włochy) nowych agonistów receptora ALX/FPR2 – AMS21 oraz CMC23. Zastosowane modyfikacje w strukturze tych związków (w porównaniu do związku referencyjnego MR-39) sugerowały ich lepszy potencjał pro-wyciszeniowy oraz immunomodulujący. Dlatego ocena ich działania neuroprotekcijnego, przeciwzapalnego oraz pro-wyciszeniowego w OHC przeprowadzona została w stężeniach nanomolarnych. Wykazano, że nowe związki CMC23 i AMS21 w sposób zależny od receptora ALX/FPR2 normalizowały podwyższone w wyniku działania LPS poziomy cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$ , IL-6). Aktywność CMC23 związana była z wpływem na szlak sygnalizacyjny STAT3/SOCS3, w tym hamowanie stymulowanej podaniem LPS aktywnej, ufosforylowanej formy białka STAT3. Natomiast w przypadku liganda AMS21, wspierający RoI efekt polegał na ograniczaniu nadmiernej aktywacji kompleksu inflammasomu NLRP3. Co więcej, doświadczenia z zastosowaniem OHC pozwoliły po raz pierwszy na wykazanie kluczowej roli



receptora ALX/FPR2 obecnego na komórkach mikrogleju w modulacji korzystnych efektów AMS21, gdyż w OHC pozbawionych mikrogleju poprzez zastosowanie kłodronatu, korzystne działanie tego liganda nie było obserwowane.

W ostatnim etapie badań, w zwierzęcym modelu immunoaktywacji *in vivo* tzw. „*sickness behavior*” opartym o jednorazowe dootrzewnowe podanie LPS dorosłym szczurom, przeprowadzono ocenę wpływu nowych egzogennych agonistów ALX/FPR2 oraz liganda endogennego LXA4 na zaburzenia behawioralne oraz parametry immunoaktywacji w homogenatach kory czołowej i hipokampa dorosłych, 3-miesięcznych samców. Zaobserwowano, że jednorazowe dootrzewnowe podanie LPS powoduje deficyty w zachowaniu zwierząt, wyrażone jako wydłużenie czasu bezruchu, przy jednoczesnym skróceniu czasu pływania i wspinania (test wymuszonego pływania, tzw. test Porsolta). Normalizujący wpływ dokomorowego podania LXA4 na zmiany opisane w teście Porsolta, był krótkotrwały, natomiast związek CMC23 wykazywał dłuższą aktywność biologiczną w tym układzie doświadczalnym. Jednocześnie przeprowadzone badania biochemiczne wykazały przeciwzapalne działanie LXA4 polegające na obniżaniu poziomu cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) tylko 1 godzinę po podaniach, natomiast działanie związku CMC23 było przedłużone i obecne także 4 godziny po jego podaniu. Wyniki te wskazują na obniżanie aktywacji prozapalnej przez badane ligandy w modelu immunoaktywacji *in vivo*, a dłuższy okres działania nowych ligandów pozwala na potencjalnie bardziej efektywne stosowanie ich w strategii RoI.

Zaprezentowane w hybrydowej wersji niniejszej rozprawy wyniki pozytywnie weryfikują cele podjętych badań. Co więcej, w oparciu o przeprowadzone wielopłaszczyznowe badania można sugerować, że nowatorskie podejście do wzmacniania endogennych mechanizmów regulacji RoI stanowić może w przyszłości o rozwoju nowej ścieżki modulacji procesów zapalnych w przebiegu wielu chorób OUN w oparciu o farmakoterapię ich wygaszania (ang. *pharmacotherapy of resolution*).