



Mgr Justyna Janowska

Rola zmian w funkcjonowaniu oligodendrocytów w patogenezie zaburzeń istoty białej będących skutkiem asfiksji neonatalnej

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie:
biologia medyczna

Promotor: dr hab. Joanna Sypecka
Promotor pomocniczy: dr hab. Małgorzata Ziemka-Nałęcz

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2021

Streszczenie rozprawy

Asfiksja okołoporodowa (zamartwica) jest według Światowej Organizacji Zdrowia drugą najczęstszą przyczyną zgonów noworodków na świecie. Do przyczyn wystąpienia asfiksji należą m.in. przedwczesny lub utrudniony poród, zakażenia, czy niedociśnienie matki. Niedotlenienie-niedokrwienie szczególnie wpływa na ośrodkowy układ nerwowy (OUN), co potwierdzają statystyki częstości występowania encefalopatii hipoksyjno-ischemicznej (HIE, ang. hypoxic-ischemic encephalopathy), zaburzenia neurorozwojowego związanego z incydem asfiksji w okresie okołoporodowym. Terminem HIE definiuje się przede wszystkim zmiany w OUN wykrywane w diagnostyce z zastosowaniem rezonansu magnetycznego, takie jak rozproszone uszkodzenia istoty szarej i białej (głównie u dzieci urodzonych przedwcześnie) oraz zmiany w obrębie jądra podstawy i wzgórza (przeważnie u dzieci urodzonych terminowo z powikłaniami niedotlenieniowo-niedokrwinnymi). U dzieci z łagodną asfiksją dalszy rozwój przebiega najczęściej prawidłowo, mogą pojawiać się jednak deficyty poznawcze lub ruchowe. Ciężkie niedotlenienie przyczynia się natomiast do rozwoju dziecięcego porażenia mózgowego, padaczki, może też zwiększać ryzyko rozwoju chorób ze spektrum autyzmu.

Obecnie brak jest skutecznych strategii terapeutycznych, które mogłyby wspierać prawidłowy rozwój OUN dotkniętego hipoksją-ischemią (HI). Jedyną zatwierdzoną i coraz częściej stosowaną praktyką jest wykorzystanie hipotermii terapeutycznej w ciągu pierwszych kilkudziesięciu godzin życia, która hamuje rozwój uszkodzenia mózgu. Wraz z zastosowaniem tej metody oraz ogólną poprawą standardów opieki neonatalnej, w ostatnich latach odnotowuje się spadek śmiertelności noworodków, jednak długoletnie obserwacje dzieci, u których zastosowano hipotermię terapeutyczną nadal wskazują na zaburzenia rozwoju istoty białej i występowanie problemów neurorozwojowych u dzieci w wieku szkolnym.

Istotę białą OUN tworzą skupiska aksonów i dendrytów neuronów otoczonych osłonką mielinową, która wytwarzana jest przez komórki zwane oligodendrocytami. Osłonka mielinowa stanowi doskonały izolator elektryczny warunkujący szybką propagację impulsów nerwowych i tworzy dla aksonów niezbędną barierę ochronną. W rozwijającym się OUN oligodendrocyty różnicują się z tzw. komórek progenitorowych oligodendrocytów (OPCs, ang. oligodendrocyte progenitor cells). Mielinizacja rozpoczyna się przed urodzeniem, jednak różnicowanie komórek progenitorowych w kierunku dojrzałych oligodendrocytów odbywa się najintensywniej w okresie okołoporodowym. Dojrzwianie komórek progenitorowych regulowane jest m. in. działaniem wielu czynników troficznych, dlatego zaburzenie homeostazy tkanki nerwowej wywołane asfiksją neonatalną może mieć także wpływ na różnicowanie tych komórek i ich dalsze funkcjonowanie. W okresie okołoporodowym najwięcej oligodendrocytów znajduje się na etapie tzw. późnych progenitorów i niedojrzałych oligodendrocytów. Badania pokazały, że wymienione komórki są szczególnie wrażliwe na uszkodzenie, obserwuje się ich apoptozę i/lub zahamowanie wzrostu. Inne doniesienia wskazują jednak na intensywną ekspansję OPCs

po asfiksji. Badacze nie są jednak zgodni co do tego, czy nowopowstałe komórki są zdolne do wytwarzania funkcjonalnej mieliny.

Przyjęta hipoteza badawcza zakłada, że pod wpływem HI progenitory oligodendrocytów cechują się zaburzonym programem wzrostu i różnicowania, który promuje utrzymanie ich w stanie progenitorowym i ogranicza dojrzewanie, co prowadzi do nieprawidłowej mielinizacji. Powyższa hipoteza została sformułowana na podstawie wyników badań prowadzonych dotychczas w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN, które wykazały, że OPCs mogą być źródłem wielu czynników neurotroficznych niezbędnych dla neuroregeneracji, szczególnie w rejonie uszkodzonej tkanki. W pracy został oceniony potencjał OPCs do wydzielania wybranego czynnika neurotroficznego, jakim jest IGF-1. Ponadto zbadane zostały zmiany w stężeniu IGF-1 w tkance nerwowej po uszkodzeniu HI oraz możliwości zastosowania tego czynnika jako potencjalnego leku, który może promować dojrzewanie oligodendrocytów w HIE.

Badania prowadzone były z wykorzystaniem trzech modeli badawczych. Model asfiksji neonatalnej *in vivo* został wywołany u 7-dniowych szczurów stada Wistar i polegał na jednostronnym podwiązaniu i przecięciu tętnicy szyjnej wspólnej, a następnie ekspozycji zwierząt na warunki niedotlenienia (7,5% tlenu) przez 60 minut. Eksperymenty prowadzone były również z wykorzystaniem hodowli pierwotnych szczurzych neonatalnych OPCs (*in vitro*) oraz hodowli organotypowych skrawków hipokampa (*ex vivo*), poddanych tymczasowemu ograniczeniu dostępu do składników odżywczych i tlenu (OGD, ang. oxygen-glucose deprivation). Zastosowana procedura stanowiła model uszkodzenia w wyniku asfiksji okołoporodowej. W wybranych punktach czasowych po uszkodzeniu, wyizolowane półkule mózgu lub komórki i tkanki w hodowli były pobierane celem przeprowadzenia analiz molekularnych, biochemicznych i mikroskopowych.

Pierwszym etapem prowadzonych badań było opracowanie optymalnych warunków hodowli pierwotnych OPCs. Wśród ocenianych parametrów były gęstość wysiania komórek, warunki tlenowe (5% O₂ lub 21% O₂), a także skład pożywki hodowlanej (bezsurowicza lub z dodatkiem 1% płodowej surowicy bydlęcej). W przeprowadzonych eksperymentach udowodniono, że każdy z ocenianych parametrów może znamienne wpływać na fenotyp komórek w hodowli, a szczególnie istotne okazało się stężenie tlenu. Coraz częściej podkreślany jest fakt, że standardowe warunki hodowlane (21% O₂), faktycznie mogą oznaczać hiperoksję, gdyż w żadnej tkance organizmu rzeczywiste stężenie tlenu nie utrzymuje się na tak wysokim poziomie. Zastosowane stężenie 5% O₂ okazało się sprzyjać utrzymaniu w hodowli dużego odsetka OPCs i zapobiegało przedwczesnemu starzeniu się hodowli. Zastosowanie wystandaryzowanych warunków hodowli umożliwiło w kolejnych etapach badanie czynników wydzielanych przez komórki pod wpływem uszkodzenia.

W modelu uszkodzenia *in vivo* w 3 dniu po HI w rejonie spoidła wielkiego, skupiska zmielinizowanych aksonów, znacznie spadła całkowita liczba późnych progenitorów oligodendrocytów. Jednocześnie zaobserwowano wzrost proliferacji tych komórek w innych rejonach mózgu, w których fizjologicznie rozpoczyna się intensywna mielinizacja, tj. w obszarze kory i prążkowie. W modelach *in vitro* oraz

ex vivo, analiza hodowli poddawanych OGD wykazała dużą przeżywalność OPCs po OGD oraz stymulację ich proliferacji. Jednocześnie jednak zwiększała się ekspresja genów związanych z dojrzewaniem tych komórek, m. in. czynników transkrypcyjnych Nkx2.2 oraz MYRF regulujących różnicowanie komórek, a także białek mielinowych MBP i MAG. Analiza biochemiczna homogenatów półkul mózgu w 14 dniu po HI wskazała, że istotnie, w modelu *in vivo* również obserwuje się zwiększoną ekspresję białek mieliny: PLP, MBP i MAG. Jednak, co ciekawe, analiza mielinizacji u szczurów dorosłych (10 tygodni po HI) potwierdziła typowy obraz kliniczny hipoksji-ischemii neonatalnej, tj. hipotrofię hipokampa, spoidła wielkiego i prążkowiec oraz obszary wyraźnej hipomielinizacji w rejonie kory, prążkowiec i CA3 hipokampa. W analizie ultrastrukturalnej ujawniono istotne zmiany w strukturze mieliny, która w warunkach fizjologicznych cechuje się ściśle upakowaną, wielowarstwową budową. U zwierząt po HI częściej występowało zjawisko rozwarstwiania się blaszek otoczki mielinowej aksonów.

Wśród czynników odpowiedzialnych za wzmoczoną proliferację OPCs i zahamowanie mielinizacji w odpowiedzi na uszkodzenie mogą przypuszczalnie znaleźć się czynniki troficzne wydzielane przez komórki gleju. W niniejszej pracy przeanalizowano potencjalny udział zmian w stężeniu IGF-1 w patofizjologii obserwowanych zmian mielinizacyjnych. Analiza zmian poziomu IGF-1 w tkance nerwowej w modelu *in vivo* wykazała istotny wzrost stężenia tego czynnika w półkuli hipoksyjno-ischemicznej w pierwszym dniu po uszkodzeniu. W badaniach *in vitro* wykazano, że oligodendrocyty mogą być źródłem IGF-1, a OGD powoduje zmniejszenie ilości wydzielanego czynnika. Z kolei suplementacja IGF-1 nie wpływała na zmiany proliferacji komórek w modelu *in vitro*, natomiast w modelu *ex vivo*, w najwyższym stężeniu tego czynnika zaobserwowano zwiększenie tempa podziału komórek. Największy wzrost liczby oligodendrocytów na wczesnych etapach dojrzewania po zastosowaniu OGD zanotowano w hodowli w pożywce zawierającej 10 ng/ml IGF-1. Zastosowanie suplementacji w tym stężeniu sprzyjało także wytwarzaniu wypustek komórkowych, co może oznaczać promowanie dojrzewania tych komórek. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazały, że OPCs w odpowiedzi na HI zaczynają intensywnie proliferować, do czego może przyczyniać się m.in. okresowy wzrost stężenia IGF-1. Krótco po uszkodzeniu obserwuje się ponadto wzrost ekspresji białek mieliny, a mimo tego wytwarzanie funkcjonalnych osłonek mielinowych jest zaburzone. Przeprowadzone badania wskazują, że IGF-1 jest jednym z czynników, które mogą skutecznie modulować dojrzewanie oligodendrocytów i ich zdolność do mielinizacji w HIE, co może przyczynić się do opracowania terapii stosowanej po wystąpieniu asfiksji okołoporodowej.