

Mgr Justyna Magdalena Gargaś

Zakład Neurobiologii Naprawczej

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Summary

Glial cells perform a number of essential biological functions both during the development of the central nervous system (CNS) and in its normal functioning. The process of gliogenesis, preceded by enhanced neurogenesis and beginning already during fetal life, is most intense during the perinatal period and early postnatal development. The properties of the cells generated during this period, which are classified as macroglia, especially oligodendrocyte progenitors (OPCs), differ significantly from those formed in adulthood. At the same time, they are extremely susceptible to microenvironmental stimuli, which is related to their response to the action of signalling molecules in neurodevelopmental processes, but thus makes them vulnerable to disturbances in tissue homeostasis or the impact of pathophysiological stimuli. This is also largely the reason for the occurrence of mostly high levels of neural tissue damage under the influence of pathophysiological factors and trauma in the perinatal period. These include neonatal hypoxia-ischemia (HI) also known as perinatal asphyxia.

Perinatal asphyxia is associated with abnormal blood flow and impaired gas exchange, leading to hypoxia/anoxia and hypercapnia. Due to reduced blood flow and inadequate oxygen availability and nutrient deficiency, including glucose, newborns develop systemic disorders, including respiratory, cardiac and hepatic disorders, renal dysfunction, and neurological diseases. The high mortality rate or motor and cognitive disabilities resulting from the injury make complications after HI a serious social problem, significantly affecting patients' quality of life. In developed countries, the problem of perinatal asphyxia affects 1-8 per 1,000 live births, while in developing countries it can be as much as 10-20 times higher. It is estimated that currently about one-fifth of neonatal deaths worldwide are caused by the effects of HI. Currently, the only available therapy used for the treatment of moderate or acute HI is therapeutic hypothermia, which involves lowering the newborn's head or body temperature to slow down progressive cellular damage, limit activation of the immune response and thus minimize the extent of tissue damage. Therapeutic hypothermia applied in the first six hours after injury significantly reduces mortality and the risk of severe disability, but in many cases it proves completely ineffective.

Despite years of multidirectional research into the mechanisms triggered by HI and the search for potential therapies, there is still no effective neuroprotective and neuroregenerative strategy targeting the repair of damaged tissue. Thus, there is an urgent need to search for new points of resolution to develop potential therapeutic strategies. One of them may be the modulation of the interactions between the cells that form neural tissue. So far, the interrelationships between glial cells in the developing brain following the temporary glucose and oxygen deficiency characteristic of perinatal asphyxia are poorly understood. Among

glial cells, there are macroglia, including astrocytes and oligodendrocytes of ectodermal origin, and microglia, originating from the mesoderm. Glial cells are involved in the normal development and functioning of the nervous system, as well as having a role in maintaining homeostasis in the tissue microenvironment and in the immune response. Activated glial cells produce an array of immunomodulatory factors, including pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines, thereby influencing the *in situ* occurring intercellular processes. Considering that each specialized type of glial cell participates in the response to imbalanced homeostasis and pathophysiological stimuli, cellular interactions can have a decisive impact on the predominance of neuroreparative processes over inflammatory and neurodegenerative mechanism, leading to the regeneration of damaged neural tissue and the restoration of its the physiological functioning.

The purpose of this study is to analyze the effects of transient oxygen-glucose deprivation (OGD), used as *in vitro* HI model, on the survival, proliferation, phenotype and morphology of neonatal rat glial cells, and to analyze their secretory profile by individual glial cell types and in their co-cultures. In order to mimic *in vitro* conditions in neural tissue, a culture system under physiological normoxia (5% oxygen concentration) was used, and selected biomimetic compounds (such as laminin, fibronectin, and a gel composed of selected extracellular matrix components) were tested to coat the surfaces of culture dishes. To assess the role of selected factors involved in interactions between glial cells, culture media of a restrictive composition based on the exclusion of the addition of animal serum, mitogens and hormones that could potentially modulate the processes studied were used. All the planned experiments were carried out on unpassaged primary cultures with the aim to preserve the properties of the cells under study.

The method thus developed for culturing individual glial cell types was then used to quantify the expression of selected active substances involved in intercellular interactions, including trophic factors such as insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). In order to investigate the processes triggered by OGD, the expression levels of the selected cytokines and their receptors were also measured. Cytokines are a group of glycoproteins produced by cells in response to immune stimuli, among other things, and regulate a number of basic cellular functions such as survival, proliferation and maturation. The cytokine family includes interleukins, chemokines, tumor necrosis factor, colony-stimulating factors, interferons and growth factors, among others. Under physiological conditions, cytokines are secreted by glial cells usually at low levels, and their secretion changes significantly after pathophysiological stimuli. They can exert an anti-inflammatory effect, promoting the activation of neuron-repair processes in damaged tissue, or a pro-inflammatory effect, exacerbating the changes that occur as a result of tissue damage. Because of their involvement in the cellular response to pathophysiological stimuli, cytokines and selected trophic factors may also play a key role in modulating intercellular interactions following temporary glucose and oxygen deprivation.

The planned studies were carried out on glial cells derived from the brains of Wistar rat pups (24-48h postpartum). A primary mixed glial culture was established from the isolated brain hemispheres. After 11-12 days of *in vitro* culture, individual glial fractions, i.e. microglia, oligodendrocyte progenitors and astrocytes, were isolated by sequential shaking, taking advantage of the differential adhesive properties of each cell type. Studies were conducted on individual cell populations, cultured either as monofractions or co-cultures. The

experiments used the following co-culture variants of oligodendrocyte progenitors with microglia or astrocytes: (A) a control variant (K); (B) an experimental variant in which one glial fraction remained the control fraction, while the other glial population in the co-culture underwent a 50-minute OGD procedure (K/OGD); (C) an experimental variant in which both glial fractions in the co-culture underwent a 50-minute OGD procedure. At the selected time points, culture media were collected, in which the concentration of selected active factors was then quantified using ultrasensitive biochemical methods such as ELISA and Luminex kits.

Analysis of the secretome of individual types of specialized glial cells cultured as monofractions showed that the main source of IGF-1, secreted *in situ* into the tissue microenvironment, are astrocytes, and to a much lesser extent microglia. It is a factor that plays a leading role in the proliferation and maturation of oligodendrocytes. Since oligodendrocyte differentiation is inhibited or delayed as a result of HI, analysis of IGF-1 secretion by glial cells co-forming neural tissue contributes to understanding the substrate of post-HI changes. Subsequently, the secretion of BDNF factor and selected cytokines and their receptors was quantified. Analyses were performed both for individual glial cell types cultured as monofractions and in their co-cultures. For several of the factors studied, a significant modulating effect of paracrine intercellular interactions on their secretion into the culture medium was demonstrated. The aforementioned effect was observed, among others, in the case of the BDNF factor, the level of which in co-cultures of oligodendrocytes and astrocytes is significantly lower than the level of secretion by the mentioned cell fractions cultured separately. A similar modulating effect of co-cultures was observed in the case of secretion of the CXCL1 chemokine by oligodendrocytes and microglia, where in all experimental variants there was a significant effect of microglia on the secretion of this chemokine by oligodendrocytes. Analysis of the concentrations of other active factors (GM-CSF, CXCL10, CCL2, CCL3, IL1 β , IL6, IL10) showed no statistically significant differences between oligodendrocyte and microglia cultures and their co-cultures. In the case of CXCR2 and CXCR4 receptors, however, a significant effect of intercellular interactions was observed in co-cultures of oligodendrocytes and astrocytes.

In conclusion, the conducted research is novel in the context of developing an efficient method for obtaining and culturing under physiological normoxia all three main types of neonatal rat glial cells. The use of culture media of the restricted composition, which exclude the presence of factors that can possibly modulate the processes under study, makes it possible to use the cultures for *in vitro* modelling of selected perinatal pathophysiological conditions. The *in vitro* models can be used both to study basic intercellular interactions (direct as well as paracrine), and can also be used in pre-clinical research to evaluate the effects of potential therapeutic treatments. In our study, the described culture system was used to model *in vitro* the neonatal HI and to study the influence of interactions between glial cells on the secretion of selected active factors involved in the cellular response to disbalance of local homeostasis or the presence of pathophysiological stimuli. As shown, in the case of selected factors and cell receptors, glial cellular interactions have a significant effect on their expression. The results obtained may be useful in the development of future therapeutic strategies to prevent the consequences of perinatal asphyxia.

Mgr Justyna Magdalena Gargaś

Zakład Neurobiologii Naprawczej

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Streszczenie

Komórki glejowe pełnią szereg podstawowych funkcji biologicznych zarówno podczas rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (OUN), jak i w jego prawidłowym funkcjonowaniu. Proces gliogenezy, poprzedzany przez nasiloną neurogenezę i rozpoczynający się już podczas życia płodowego, jest najbardziej intensywny w okresie okołoporodowym oraz we wczesnym rozwoju postnatalnym. Właściwości powstających w tym okresie komórek zaliczanych do makrogleju, szczególnie progenitorów oligodendrocytów (OPCs), różnią się znacząco od komórek powstałych w dorosłym życiu. Jednocześnie są one wyjątkowo podatne na działanie bodźców mikrośrodowiskowych, co jest związane z ich odpowiedzią na działanie cząstek sygnałowych w procesach neurorozwojowych, ale tym samym czyni je wrażliwymi na zaburzenia homeostazy tkankowej czy też wpływ bodźców patofizjologicznych. Jest to również w dużej mierze przyczyną występowania najczęściej wysokiego stopnia uszkodzeń tkanki nerwowej pod wpływem czynników patofizjologicznych oraz urazów w okresie okołoporodowym. Zaliczamy do nich m.in. neonatalną hipoksję-ischemię (HI) zwaną także asfiksją okołoporodową.

Asfiksja okołoporodowa związana jest z nieprawidłowym przepływem krwi oraz zaburzoną wymianą gazową w okresie okołoporodowym, prowadzącą do hipoksji/anoksji i hiperkapnii. Z powodu obniżonego przepływu krwi i niedostatecznej dostępności tlenu oraz niedoboru substancji odżywczych, w tym glukozy, u noworodków dochodzi do zaburzeń ogólnoustrojowych, w tym oddechowych, do zakłóceń pracy serca i wątroby, dysfunkcji nerek, a także do zaburzeń neurologicznych. Wysoka śmiertelność lub niepełnosprawność motoryczna i poznawcza będąca skutkiem przebytego urazu sprawiają, że powikłania po HI stanowią istotny problem społeczny, znacząco wpływając na pogorszenie jakości życia pacjentów. W krajach rozwiniętych problem asfiksji okołoporodowej dotyczy 1-8 na 1000 żywych urodzeń, natomiast w krajach rozwijających się może być nawet 10-20-krotnie wyższy. Szacuje się, że obecnie około jedna piąta zgonów noworodków na całym świecie spowodowana jest przez skutki HI. Obecnie jedyną stosowaną terapią w przypadku umiarkowanej lub ostrej HI jest hipotermia terapeutyczna, polegająca na obniżeniu temperatury głowy lub ciała noworodka, w celu spowolnienia postępującego uszkodzenia komórek, ograniczenia aktywacji odpowiedzi immunologicznej i tym samym zminimalizowania stopnia uszkodzeń tkanek. Hipotermia terapeutyczna zastosowana w pierwszych sześciu godzinach od urazu znacząco zmniejsza śmiertelność i ryzyko ciężkiej niepełnosprawności, jednak w wielu przypadkach okazuje się całkowicie nieskuteczna.

Pomimo wieloletnich i wielokierunkowych badań nad mechanizmami uruchamianymi w wyniku HI i poszukiwaniu potencjalnych terapii, nadal brak jest skutecznej strategii neuroprotektynowej i neuroregeneracyjnej, celującej w naprawę uszkodzonej tkanki. Istnieje zatem pilna potrzeba poszukiwania nowych punktów uchwytu do opracowywania potencjalnych strategii terapeutycznych. Jednym z nich może być modulacja wzajemnych

oddziaływań między komórkami tworzącymi tkankę nerwową. Jak dotąd, wzajemne zależności między komórkami glejowymi w rozwijającym się mózgu po wystąpieniu okresowego niedoboru glukozy i tlenu charakterystycznego dla asfiksji okołoporodowej są słabo poznane. Wśród komórek glejowych wyróżnia się makroglej, w tym astrocyty i oligodendrocyty pochodzenia ektodermalnego oraz mikroglej, wywodzący się z mezodermy. Komórki glejowe zaangażowane są w prawidłowy rozwój i funkcjonowanie układu nerwowego, jak również mają swój udział w utrzymaniu homeostazy w mikrośrodkowisku tkankowym oraz w odpowiedzi immunologicznej. Aktywowane komórki glejowe produkują wachlarz czynników immunomodulujących, w tym cytokin o działaniu prozapalnym lub przeciwzapalnym, wpływając w ten sposób na odpowiedź immunologiczną. Uwzględniając, że każdy wyspecjalizowany typ komórek glejowych uczestniczy w odpowiedzi na zaburzenia homeostazy i bodźce patofizjologiczne, wzajemne oddziaływanie komórek może mieć decydujący wpływ na przebieg procesów neuronaprawczych nad zapalnymi i neurodegeneracyjnymi, prowadząc do regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej i przywrócenia fizjologicznego funkcjonowania tworzących ją komórek.

Celem niniejszej pracy jest analiza wpływu okresowego niedoboru tlenu i glukozy (ang. OGD, *oxygen-glucose deprivation*), stanowiącego model HI *in vitro* na przeżywalność, proliferację, fenotyp i morfologię neonatalnych szczurzych komórek glejowych oraz analiza ich profilu sekrecyjnego, komórek hodowanych jako monokultury oraz współhodowle. W celu jak najlepszego naśladowania *in vitro* warunków panujących w tkance nerwowej, zastosowano system hodowli w warunkach normoksji fizjologicznej (5 % stężenie tlenu), a także przetestowano wybrane związki biomimetyczne (takie jak laminina, fibronektyna, żel skomponowany z wybranych składników macierzy zewnątrzkomórkowej) do pokrywania powierzchni hodowlanych. Aby ocenić rolę wybranych czynników zaangażowanych w oddziaływanie między komórkami glejowymi, zastosowano pożywki hodowlane o restrykcyjnym składzie, opartym na wykluczeniu dodatku surowicy zwierzęcej, mitogenów, hormonów oraz innych czynników, mogących potencjalnie modulować badane procesy. Wszystkie zaplanowane eksperymenty przeprowadzono na niepasażowanych hodowlach pierwotnych, aby jak najlepiej zachować właściwości badanych komórek.

Tak opracowaną metodę hodowli poszczególnych typów komórek glejowych zastosowano następnie do ilościowej oceny ekspresji wybranych substancji aktywnych, zaangażowanych w oddziaływanie międzykomórkowe, w tym czynników troficznych, takich jak insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGF-1) oraz czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF). W celu zbadania procesów uruchamianych w następstwie OGD, zmierzono także poziom ekspresji wybranych cytokin i ich receptorów. Cytokiny stanowią grupę glikoprotein wytwarzanych przez komórki w odpowiedzi m.in. na bodźce immunologiczne i regulują szereg podstawowych funkcji komórek takich jak przeżycie, proliferacja czy dojrzewanie. Do rodziny cytokin zaliczamy m.in. interleukiny, chemokiny, czynnik martwicy nowotworów, czynniki stymulujące tworzenie kolonii, interferony oraz czynniki wzrostu. W warunkach fizjologicznych cytokiny wydzielane są przez komórki glejowe najczęściej na niskim poziomie, a ich sekrecja ulega znaczącej zmianie po wystąpieniu bodźców patofizjologicznych. Mogą one oddziaływać przeciwzapalnie, sprzyjając uruchomieniu w uszkodzonej tkance procesów o charakterze neuronaprawczym, lub pro-zapalnie, nasilając zmiany zachodzące w wyniku uszkodzenia. Ze względu na ich udział w odpowiedzi komórek na bodźce patofizjologiczne, cytokiny oraz wybrane czynniki troficzne mogą pełnić także kluczową rolę w modulowaniu oddziaływań międzykomórkowych po wystąpieniu okresowego niedoboru glukozy i tlenu.

Zaplanowane badania przeprowadzono na komórkach glejowych pochodzących z mózgow osesków szczura (24-48h *postpartum*) obu płci stada Wistar. Z wyizolowanych

półkul mózgu zakładano mieszaną glejową hodowlę pierwotną. Po 11-12 dniach hodowli *in vitro*, wyodrębniano poszczególne frakcje glejowe, tj. mikroglej, progenitory oligodendrocytów oraz astrocyty poprzez sekwencyjne wytrząsanie, wykorzystując zróżnicowane właściwości adhezyjne poszczególnych typów komórek. Badania prowadzono na poszczególnych populacjach komórkowych, hodowanych jako monofrakcje oraz ich współhodowlach. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystywano następujące warianty współhodowli progenitorów oligodendrocytów z mikroglejem lub z astrocytami: A) wariant kontrolny (K); B) wariant eksperymentalny, w którym jedna frakcja glejowa pozostawała frakcją kontrolną, zaś druga populacja glejowa we współhodowli poddawana była 50-minutowej procedurze OGD (K/OGD); C) wariant eksperymentalny, w którym obie frakcje glejowe we współhodowli poddawano 50-minutowej procedurze OGD. W wybranych punktach czasowych zbierano pożywki hodowlane, w których następnie oceniano ilościowo stężenie wybranych czynników aktywnych przy zastosowaniu ultraczułych metod biochemicznych, takich jak zestawy ELISA oraz Luminex.

Analiza sekretomu poszczególnych typów wyspecjalizowanych komórek glejowych hodowanych jako monofrakcje wykazała, że głównym źródłem IGF-1, wydzielanego *in situ* do mikrośrodowiska tkankowego są astrocyty, oraz w dużo mniejszym stopniu mikroglej. Jest to czynnik pełniący wiodącą rolę w proliferacji oraz dojrzewaniu oligodendrocytów. Ponieważ na skutek HI różnicowanie oligodendrocytów jest zahamowane lub opóźnione, analiza wydzielania IGF-1 przez komórki glejowe współtworzące tkankę nerwową przyczynia się do poznania podłoża zmian zachodzących po wystąpieniu HI. W dalszej kolejności oceniono ilościowo sekrecję czynnika BDNF oraz wybranych cytokin i ich receptorów. Analizy przeprowadzono zarówno dla poszczególnych typów komórek glejowych hodowanych jako monofrakcje, jak i w ich współhodowlach. W przypadku kilku z badanych czynników wykazano znamienne modulujący wpływ parakrynych oddziaływań międzykomórkowych na ich wydzielanie do pożywki hodowlanej. Wspomniany wpływ zaobserwowano m.in. w przypadku czynnika BDNF, którego poziom we współhodowlach oligodendrocytów i astrocytów jest znacznie niższy niż poziom sekrecji przez wymienione frakcje komórkowe hodowane oddzielnie. Podobny modulujący wpływ współhodowli zaobserwowano w przypadku wydzielania chemokiny CXCL1 przez oligodendrocyty i mikroglej, gdzie we wszystkich wariantach doświadczalnych odnotowano znamienne wpływ mikrogleju na wydzielanie wymienionej chemokiny przez oligodendrocyty. Analiza stężeń innych czynników aktywnych (GM-CSF, CXCL10, CCL2, CCL3, IL1 β , IL6, IL10) nie wykazała znamienych statystycznie różnic pomiędzy hodowlami oligodendrocytów i mikrogleju a ich współhodowlami. W przypadku receptorów CXCR2 i CXCR4, znamienne wpływ oddziaływań międzykomórkowych zaobserwowano natomiast we współhodowlach oligodendrocytów i astrocytów.

Podsumowując, przeprowadzone badania mają nowatorski charakter w kontekście opracowania wydajnej metody pozyskiwania i hodowli w warunkach normoksji fizjologicznej wszystkich trzech głównych typów neonatalnych szczurzych komórek glejowych. Zastosowanie pożywek o restrykcyjnym składzie, wykluczających obecność czynników mogących wpływać modulująco na badane procesy, umożliwia wykorzystanie hodowli do modelowania *in vitro* wybranych okołoporodowych stanów patofizjologicznych. Modele *in vitro* mogą służyć zarówno do poznania oddziaływań międzykomórkowych (bezpośrednich, jak i parakrynych), a także mogą znaleźć zastosowanie w badaniach przedklinicznych do testowania wpływu potencjalnych substancji terapeutycznych na komórki glejowe. W przeprowadzonych badaniach, opisany system hodowli został wykorzystany do modelowania *in vitro* neonatalnej HI i badania oddziaływań między komórkami glejowymi na sekrecję wybranych czynników aktywnych, biorących udział w odpowiedzi komórkowej na

zaburzenia lokalnej homeostazy czy obecność czynników patofizjologicznych. Jak wykazano, w przypadku wybranych czynników oraz receptorów komórkowych, oddziaływania międzykomórkowe mają znamienny wpływ na ich ekspresję. Uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie w opracowywaniu przyszłych strategii terapeutycznych do zapobiegania skutkom asfiksji okołoporodowej.