

**Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova**

**Școala doctorală**



**Teză de doctorat**

**Modularea *in vivo* a motilității microgliale sub  
influența inhibitorilor de ciclooxygenază**

**Rezumat**

**Conducător Doctorat: Prof. Dr. Maria Iancău**

**Student doctorand: Bogdan Cătălin**

**Craiova**

**2013**

## **Introducere**

Datorită duratei de viață mai mari, în țările dezvoltate și în curs de dezvoltare, populația suferă, la nivel global, un proces de îmbătrânire având ca rezultat apariția unor noi probleme de sănătate, în special pentru vârsta înaintată.

## **Partea I - Stadiul cunoașterii**

### **Capitolul 1 Funcția microglială la nivelul SNC**

#### **1.1 Introducere**

Microglia reprezintă celula inflamatorie rezidentă la nivelul cortexului. Aceasta îndeplinește un rol cheie pentru funcția normală a creierului. Orice dezechilibru în activitatea microglială poate contribui la apariția unor boli neurodegenerative, în ciuda faptului că aceasta reprezintă doar 10% din parenchimul normal al creierului (Lawson et al. 1990).

#### **1.2 Motilitatea microglială în creierul normal**

Înregistrarea activității microgliale, în SNC intact, relevă existența unei mișcări continue a ramificațiilor acestora (Davalos et al. 2005). În parenchimul normal microglia are un corp celular mic cu ramificații numeroase.

#### **1.3 Motilitatea microglială în creierul lezat**

Indiferent de natura leziunii detectate microglia va reacționa rapid. Primele semne ale unei reacții microgliale vor apărea în câteva minute, când începe să se observe o schimbare de morfologie celulară numită polarizare. Acesta este urmată apoi de o extensie a procesele spre locul leziunii. Migrarea corpului celular și fagocitoza resturilor celulare vor încheia răspunsul inflamator microglial (Hanisch și Kettenmann 2007).

Răspunsul microglial are la bază un echilibrul realizat între sistemele de semnalizare ITAM-ITIM și răspunsul activator / inhibitor al receptorilor din aceste sisteme, împreună putând regla atât magnitudinea cât și natura răspunsului declanșat.

### **Capitolul 2 Împlicațiile microgliale în patologia Alzheimer.**

#### **2.1 Introducere**

Există două teorii cu privire la implicarea microglială în boala Alzheimer. Prima, cea a neuroinflamației, are la bază existența depozitelor de amiloid. Aceasta pleacă de la premisa că amiloidul activează microglia determinând neurodegenerare și astfel ducând la apariția demenței Alzheimer (Streit, et al. 2004a).

A doua ipoteză este cea a disfuncției microgliale. Aceasta consideră microglia ca având un clearance scăzut de beta-amiloid (A $\beta$ ), un suport trofic diminuat și o neurotoxicitate crescută (Streit, et al. 2004b).

#### **2.2 Relația microglie amiloid**

Acumularea de amiloid la nivel cerebral reprezintă o caracteristică definitorie a bolii Alzheimer (AD). Microglia a fost asociată cu depozite de A $\beta$  cerebrale, de foarte

multă vreme (Stalder et al. 1999), însă există încă numeroase întrebări cu privire la rolul său în patologia AD (Morgan et al. 2005).

### **2.3 Funcția microglială în boala Alzheimer**

A fost sugerat faptul că microglia devine disfuncțională și astfel îi scade eficiența în îndepărtarea și degradarea A $\beta$  în boala Alzheimer (Lee 2010; Hickman et al 2008). De asemenea o serie de cercetări sugerează că majoritatea receptorilor și enzimele implicate în asimilarea și degradarea A $\beta$  de către microglie sunt insuficient reprezentate într-un model experimental de boală Alzheimer (Hickman et al. 2008).

Recent s-a arătat că funcția microgliale poate fi restaurată prin vaccinarea anti-A $\beta$ , chiar dacă ar exista o disfuncție celulară dezvoltată în cursul AD (Krabbe colab. 2013).

### **2.4. Activarea microglială în patologia Alzheimer**

Activitatea microglială în contextul bolii AD pare să aibă dublu efect. Pe de o parte, activarea lor pare a fi neuroprotectoare în fazele incipiente ale bolii, dar la vârste înaintate și la pacienții grav bolnavi, efectele ar putea fi nocive (Solito et al. 2012).

## **Capitolul 3 Antiinflamatoarele nesteroidiene și boala Alzheimer**

### **3.1 Ciclooxygenaza - implicații în inflamație și cogniție**

Datele sugerează că, pe de o parte, există un rol important al PGE<sub>2</sub>, derivată prin mediere COX-2, în menținerea funcției de memorie și pe de altă parte, un nivel ridicat de PGE<sub>2</sub> poate semnală un răspuns inflamator precoce (Cunningham 2012). Un studiu longitudinal a raportat o creștere precoce a PGE<sub>2</sub>, urmată de o scădere a nivelului acestora odată cu apariția clinică a pierderilor minore de cogniție (Combrinck colab. 2006).

### **3.2. Microglia, sinteza de PG și antiinflamatoarele nesteroidiene**

Microglia este cunoscută ca având dublu rol la nivel cerebral: principala sursă de PG cerebrale și tinta ideală pentru anti-inflamator nesteroidian (AINS). În culturi de celule, antiinflamatoarele nesteroidiene clasice pot să reducă sinteza de PGE<sub>2</sub> fără a interacționa cu activitatea COX-1, COX-2, AA sau PGES (Greco et al. 2003).

### **3.3. Carprofen ca inhibitor de COX**

Carprofenul (Rimadyl) este un medicament anti-inflamator nesteroidian (AINS) din clasa acidului propionic, care include ibuprofen, naproxen, și ketoprofen.

#### **3.3.2 Farmacologie clinică**

Timpul mediu de înjumătățire a carprofenului este de aproximativ 8 ore, cu un interval între 4.5-9.8 ore. După o doză de 100 mg intravenoasă în bolus, timpul mediu de înjumătățire a fost calculată la 11,7 ore.

#### **3.3.3 Doză și mod de administrare**

Doza recomandată pentru administrare subcutanată este de 2 mg/kg (4,4mg/kg) pe zi.

## **II Contribuții personale**

### **4. Scop și obiective**

Scopul principal al acestei teze a fost de a studia modul în care inhibitorii de ciclooxigenaza (COX1, COX2 și COX3) afectează motilitatea microglială în cortexul normal. Cea de a doua parte a studiului a fost de a observa dacă motilitatea microglială suferă modificări în prezența beta-amiloidului, confirmându-se astfel ipoteza disfuncției microgliale.

### **5. Material și metodă**

#### **5. 1. Lot de animale**

Animalele au fost crescute într-un mediu steril, cu o temperatură constantă de 21° C. Umiditatea din cameră a fost păstrată între 40 și 70%.

Studiile au fost făcute pe șoareci mono și dublu transgenici, de 3 până la 5 luni, cu o greutate medie de 30 de grame.

##### **5.1.1. Șoarecii monotransgenici**

Șoarecii monotransgenici investigați exprimă o proteină fluorescentă verde la nivelul membranelor monocitelor, macrofagelor și microgliilor. Aceștia au fost obținuți prin implantarea genei reporter EGFP ( o proteina fluorescentă verde) în locusul Cx3cr1, care codifică receptorul CX3CR (Jung 2000).

##### **5.1.2. Șoarecii dublutransgenici**

Șoareci transgenici care supraexprimă proteina precursoră a amiloidului (APP) și mutație suedeză PSEN1 (APPSwe p PSEN1/DE9) furnizați de Jackson Labs au fost, pentru acest studiu, împerechiați cu animale homozigote cu microglijii fluorescente. Șoarecii obținuți în urma acestei încrucișări coexprimă atât APP, non fluorescent, cât și microglijii fluorescente.

În acest studiu s-au folosit un total de 17 animale (178 celule analizate). Majoritatea animalelor a fost reprezentate de șoareci monotransgenici (15: 8 masculi și 7 femele). Doar două animale dublu transgenice de sex feminin au fost utilizate.

Au fost investigate cinci grupuri distincte.

#### **5. 2. Metode folosite în studiul de față**

##### **5. 2.1. Designul studiului**

Acest studiu a fost conceput ca unul acut. După o acomodare de 24 h, s-a efectuat o injecție subcutanată pentru toate animalele investigate. Într-un interval de aproximativ 12 ore (între 10 și 14 de ore), animalul a fost operat, realizând o fereastră

craniană deasupra cortexul somato-senzorial drept. O singură sesiune de achiziție de imagini a fost realizată pentru fiecare animal.

După achiziția imaginilor digitale de 5x și 20x a cortexului țintă, s-a înregistrat o referință de 30 de minute pentru fiecare animal. După ce această înregistrare a fost făcută, cu ajutorul laserului s-a efectuat o microleziune, după care s-a înregistrat activitatea microglială încă aproximativ 60 de minute.

### **5.2.2. Injecția subcutană**

Înainte de injectare, soarecii au fost aneștizați cu izofluran. Pielea de pe spatele animalului, din dreptul piciorului drept, a fost rificată permițând efectuarea injecției.

### **5.2.3. Anestezia**

Deoarece implantarea fereastră craniene necesită o multitudine de manevre operatorii, ca anestezie pentru această etapă s-a folosit o soluție de ketamină (100mg/ml) și xilină (20mg/ml).

### **5.2.4. Operația**

Pielea care acoperea craniul a fost îndepărtată, pentru o bună vizualizare a osului. După curățarea completă, s-a realizat o craniotomie în osul parietal drept.

După ce craniotomia este finalizată și dura este curată se aplică Kwik-Sil. O mică bucată de sticlă este lăsată să cadă pe Kwik-Sil și cianoacrilatul (superglue) este aplicat pe marginile sale.

Când lipiciul s-a întărit, este aplicat ciment dentar pe toată suprafața expusă a oaselor, dar și pe marginile sticlei. O perioadă de minimum 2 ore trebuie să treacă până la prima sesiune de achiziție a imaginilor.

### **5.2.5. Microscopia cu doi fotoni**

Microscopia de înaltă rezoluție, *in vivo*, a fost realizată cu ajutorul sistemului de scanare laser cu doi fotoni (2P-LSM), echipat cu un impulsuri fs de laser, provenite de la un cristal de titan-safir cu o putere de maximă de 3,3 W și o capacitate de stimulare între 680nm la 1080nm, capabil să înregistreze simultan până la patru canale.

### **5.2.6. Protocolul de imagistică**

Secțiuni paralele și uniforme au fost înregistrate și apoi prelucrate pentru a obține imagini de adâncime a parenchimului cerebral. Timpul total de achiziție pentru un moment al unei secțiuni de 50-60 micrometri a fost de aproximativ 2 min. Înregistrările au fost obținute 30 de minute înainte de leziune și 60 minute după.

### **5.2.7. Analiza Sholl**

S-a realizat analiza morfologică a proceselor microgliale prin analiză Sholl.

## **6. Rezultate**

Am investigat comportamentul microglial, atât în creierul intact în timpul stării de supraveghere glială, cât și imediat după un traumatism local.

### **6.1 Grupul control**

Analiza vitezelor proceselor microgliale aflate în stare de supraveghere și a proceselor microgliale în stare activată arată o creștere cu aproximativ 50% a vitezelor proceselor microgliei în stare activată în raport cu starea de supraveghere ( $p < 0,0001$ ). Nu a fost găsite diferențe statistice atunci când s-a analizat variația ( $p = 0,2$ ) celor două stări microgliale.

Analiza Sholl a relevat un teritoriu maxim al microgliei aflată în stare de supraveghere de aproximativ 45 microm. Lungimea medie a proceselor microgliale a fost de aproximativ 25 microm.

### **6.2 Grupul tratat cu doză subterapeutică**

Analiza proceselor microgliale în starea de supraveghere și în cea activă la acest grup arată o scădere a vitezei proceselor microgliale activate, în raport cu starea de supraveghere ( $p < 0,0052$ ).

### **6.3 Grupul tratat cu doză terapeutică**

Înregistrarea continuă a aceleași regiuni a creierului arată o scădere a vitezei procesului microgliei activate, în raport cu starea de supraveghere ( $p = 0,007$ ), la cei tratați cu doza terapeutică.

Analiza Sholl arată, în aceste condiții, o microglie cu un teritoriu maxim de aproximativ 38 um.

### **6.4 Grupul tratat cu dublul dozei terapeutice**

Singura diferență notabilă între starea de supraveghere a microgliei și cea activată o reprezintă variația vitezelor proceselor microgliale la microglia activată ( $p < 0,0001$ ). Analiza Sholl relevă un teritoriu maxim microglial de aproximativ 38 um.

### **6.5 Grupul cu modelul animal Alzheimer**

Nici o diferență statistică semnificativă nu a fost înregistrată între cele două stări microgliale ( $p = 0,15$ ), la lotul cu supraproducție de APP.

### **6.6 Comparația control - animale tratate**

Nici o diferență fiziologică nu a fost observată în comportamentul microglial față de leziunea necrotică indusă.

### **6.7 Comparația control - animale APP**

Vitezele proceselor microgliale aflate în stare de supraveghere nu au fost diferite semnificativ între grupul de control și cel cu AD ( $p < 0,05$ ).

După leziune, viteza proceselor trimise spre locul leziunii necrotice a diferit semnificativ între cele două grupuri ( $p = 0,15$ ).

### **6.8 Analiza tuturor grupurilor**

Rezultatele nu arată nici o diferență semnificativă în vitezele proceselor microgliale aflate în stare de supraveghere, la loturile analizate ( $p > 0,05$ ).

După leziune toate grupurile au avut aceeași reacție microglială.

Testul ANOVA a arătat o diferență semnificativă statistic ( $p < 0,0001$ ), între grupul control și toate celelalte loturi analizate o dată cu activarea microgliei.

## 7. Discuții

Cei mai mulți oameni de știință consideră că microglia este implicată în patologia AD, deși există încă o dezbateră cu privire la modul în care aceasta afectează funcția creierului în cazul AD.

### 7.1 Principalele observații

#### 7.1.1 Activitatea microglială normală

Analiza vitezei proceselor microgliale, aflate în cele două stări, arată o creștere de aproximativ 50% a vitezei procesului microglial în stare activă ( $p < 0,0001$ ), confirmând astfel că modelul ales este adecvat pentru a evalua motilitatea microglială, atât în condiții normale, cât și în parenchimul cerebral modificat.

#### 7.1.2 Motilitatea microglială sub influența inhibitorilor de ciclooxigenază

Pentru toate animalele grupurilor tratate cu inhibitori de ciclooxigenază (COX), nu am găsit nici o diferență statistică între vitezele proceselor microgliale aflate în stare de supraveghere. Acest lucru poate însemna că beta-amiloid este eliminat de microglie chiar și sub influența AINS. La analiza vitezei proceselor trimise spre o leziune necrotică am constatat, spre surprinderea noastră, că toate grupurile tratate nu a reușit să își crească viteza proceselor, deși au păstrat reacția normală.

#### 7.1.3 Motilitatea microglială și beta amiloidul

În cadrul experimentele noastre nu am remarcat nicio activitate microglială aparte la celulele grupate în jurul depozitelor de beta amiloid din parenchimul nelezat. Când însă am realizat o leziune necrotică în apropierea acestora, am putut observa procese microgliale trimise de celule grupate spre leziune necrotică, ceea ce arată în mod clar că și microgliile grupate sunt capabile să reacționeze.

În contrast cu rezultatele noastre, alte rapoarte efectuate asupra dinamicii microgliale asociate grupărilor amiloidice au aratat că motilitatea microglială devine afectată în prezența A $\beta$  (Koenigsnecht-Talboo et al. 2008, Krabbe et al. 2013).

### 7.2 Relevanță clinică

Măsurătorile transcraniale *in vivo* ale dinamicii microgliale aflate sub influența AINS arată că în parenchimul normal a creierului în starea de supraveghere, motilitatea microglială nu este afectată făcând ca inhibitori de COX să reprezinte un tratament ideal în stadii incipiente de AD.

## 8. Concluzii

1. Analiza vitezele proceselor microgliale aflate în cele două forme înregistrate, de supraveghere și activă, a aratat o creștere de aproximativ 50% a vitezelor proceselor microgliei activate față de cea în stare de supraveghere ( $p < 0,0001$ ) și nicio diferență semnificativă globală între rezultatele noastre și cele descrise anterior ( $p > 0.05$ ), **validând astfel modelul nostru experimental.**
2. Încercarea de a înregistra activitatea microglială, sub influența anti-inflamatoare a inhibitorilor de ciclooxigenază, a dus la tratarea unui grup de animale cu doză subterapeutică de Carprofen (1mg/kg). La aceștea nu am

reușit să identificăm **nicio diferență statistică a vitezei proceselor microgliale aflate în stare de supraveghere față de grupul control ( $p > 0,05$ )**, însă procesele microgliei activate au fost **semnificativ mai mici față de grupul control, atunci când s-a făcut analiza proceselor microgliilor activate ( $p = 0,0012$ )**.

3. Comportamentul microglial, în grupul tratat cu doză terapeutică (5mg/kg) este similar cu cel al grupului control dar și al celui cu animalele tratate cu 1mg/kg. **Nicio diferență statistică nefiind înregistrată pentru vitezele proceselor microgliale aflate în stare de supraveghere ( $p > 0,05$ ), dar cu diferență semnificativă statistic în starea activată ( $p = 0.007$ )**. După o oră de la leziunea necrotică microgliile, analizate la grupul control și cel tratat cu 1 mg / kg au fost capabile să formeze un inel de protecție în jurul leziunii, în timp ce **microgliile grupului tratat, cu 5 mg/kg, nu au reușit să izoleze complet leziunea**.
4. Vitezele proceselor microgliale aflate în stare de supraveghere la șoarecii tratați cu **10mg/kg au fost similare cu viteze tuturor celorlalte grupuri ( $p > 0,05$ )**. Microgliile analizate la aceste grupuri **nu au reușit să înconjoare complet leziune**.
5. Rezultatele noastre au arătat, **pentru prima dată** că, microglia la șoareci tratați cu AINS au viteza proceselor microgliale aflate în stare activă nemodificată față de stare de supraveghere, sugerând că tratamentele cu **inhibitor de ciclooxigenază afectează motilitatea microgliei activate** și nu a celei aflate în starea de supraveghere, astfel studiile clinice, care utilizează AINS ca medicamente împotriva bolii Alzheimer, ar trebui să ia în considerare folosirea unor doze mici de inhibitori ai ciclooxigenazei.
6. **Microgliile sunt capabile să răspundă în același mod în creierul normal și cel cu APP**, fără a fi înregistrate modificări de morfologice sau de comportament, cu excepția aglomerărilor microgliale observate la șoarecii cu APP, comparativ cu animalele normale. **Viteza proceselor microgliale aflate în stare de supraveghere nu a diferit statistic între șoarecii cu APP și cei din grupul de control ( $p > 0,05$ )**. Microglia prezentă în creierul șoarecilor cu APP nu prezintă semne de disfuncție în creierul intact. Cu toate acestea, viteza proceselor microgliilor activate la grupul de șoareci cu APP **nu a înregistrat nici o diferență semnificativă față de starea de supraveghere ( $p = 0,15$ )**, arătând că **motilitatea celulară și activitatea fagocitară sunt două funcții care par să fi afectate la șoareci cu APP, comparativ cu animalele sănătoase de aceeași vârstă**.
7. Prin utilizarea analizei Sholl la toate grupurile de animale, am reușit să arătăm ca tratamentul anti-inflamator cu un **inhibitor de COX pare a avea un efect direct asupra ramificației microgliale, reducând lungimea maximă a acestora, pentru toate grupurile tratate**.



8. Rezultatele noastre sugerează că **tratamentul cu AINS este benefic doar în stadii incipiente ale AD, acesta fiind necesar a fi inițiat și menținut în doze mici putând fi dăunător în stadiile avansate ale AD.**

### 9. Bibliografie selectivă

1. Combrinck, M, Williams, J, De Berardinis, MA, Warden, D, Puopolo, M, Smith, AD and Minghetti, L 2006, 'Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, vol. 77, no. 1, pp. 85-8.
2. Cunningham, C and Skelly, DT 2012, 'Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cognitive Function: Are Prostaglandins at the Heart of Cognitive Impairment in Dementia and Delirium?', *Journal of Neuroimmune Pharmacology* vol. 7, no. 1, pp. 60-73
3. Davalos, D, Grutzendler, J, Yang, G, Kim, JV, Zuo, Y, Jung, S, Littman, DR, Dustin, ML and Gan, WB 2005, 'ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo', *Nat Neurosci*, vol. 8, no. 6, pp. 752-8.
4. Greco, A, Ajmone-Cat, MA, Nicolini, A, Sciulli, MG and Minghetti, L 2003, 'Paracetamol effectively reduces prostaglandin E2 synthesis in brain macrophages by inhibiting enzymatic activity of cyclooxygenase but not phospholipase and prostaglandin E synthase', *J Neurosci Res*, vol. 71, no. 6, pp. 844-52.
5. Hanisch, UK and Kettenmann, H 2007, 'Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain', *Nat Neurosci*, vol. 10, pp. 1387–1394. doi: 10.1038/nn1997.
6. Hickman, SE, Allison, EK and El Khoury, J 2008, 'Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice', *J Neurosci*, vol. 28, pp. 8354–8360, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.
7. Jung, S, Aliberti, J, Graemmel, P, Sunshine, MJ, Kreutzberg, GW, Sher, A and Littman, DR 2000, 'Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion', *Mol Cell Biol*, vol. 20, no. 11, pp. 4106-14.
8. Koenigsknecht-Talboo, J, Meyer-Luehmann, M, Parsadanian, M, Garcia-Alloza, M and Finn, MB et al. 2008, 'Rapid microglial response around amyloid pathology after systemic anti-Abeta antibody administration in PDAPP mice', *J Neurosci*, vol. 28, pp. 14156–14164.
9. Krabbe, G, Halle, A, Matyash, V, Rinnenthal, JL and Eom, GD et al. 2013, 'Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology', *PLoS ONE*, vol.8, no.4: e60921. doi: 10.1371/journal.pone.0060921.
10. Lawson, LJ, Perry, VH, Dri, P and Gordon, S 1990, 'Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain', *Neuroscience*, vol. 39, no. 1, pp. 151-70.
11. Lee, CY and Landreth, GE 2010, 'The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain', *J Neural Transm*, vol.117, pp. 949–960, doi: 10.1007/s00702-010-0433-4.

12. Solito, E, McArthur, S, Christian H, Gavins F, Buckingham JC and Gillies, GE 2008, 'Annexin A1 in the brain – undiscovered roles?', *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 29, pp. 135–142, doi: 10.1016/j.tips.2007.12.003.
13. Streit, WJ 2004a, 'Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis', *J Neurosci Res*, vol. 77, no. 1, pp. 1-8.
14. Streit, WJ, Mrak, RE and Griffin, WS 2004b, 'Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective', *J Neuroinflammation*, vol. 1, no. 1, pp. 1-4.