



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Farmaceutyczny

Katarzyna Anna Lipke

**Ocena wpływu lamiwudyny i zydowudyny oraz kwasu
palmitynowego na komórki mikrogleju i neuronów
dopaminergicznych jako potencjalnych czynników
neurodegeneracyjnych**

Evaluation of the effects of lamivudine and zidovudine and palmitic acid on
microglia cells and dopaminergic neurons as potential inducers of
neurodegeneration

Rozprawa doktorska na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Promotor: prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Promotor pomocniczy: dr Adriana Kubis-Kubiak

Katedra i Zakład Toksykologii

Wrocław, 2024 rok

Streszczenie

Zakażenie ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV, *ang. Human Immunodeficiency Virus*) stanowi globalny problem zdrowotny, dotyczący milionów ludzi na całym świecie. Skuteczność leczenia pacjentów zakażonych wirusem HIV znacznie się poprawiła, a oczekiwana długość życia została istotnie wydłużona dzięki opracowaniu licznych strategii terapeutycznych w ciągu ostatnich kilku dekad, jednak zaobserwowano występowanie chorób współistniejących, które obniżają jakość życia takich osób. Ponadto, pomimo stosowanej terapii, niektóre obszary organizmu, w tym ośrodkowy układ nerwowy (OUN), pozostają podatne na trwającą replikację wirusa, stanowiąc jego rezerwuuar i uniemożliwiając kompletną eradykację wirusa.

Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI, *ang. nucleoside reverse transcriptase inhibitors*) pozostają kluczowe w leczeniu HIV, a do najważniejszych leków z tej grupy należą abakawir, lamiwudyna (3TC), zydowudyna (AZT) i tenofowir. Jednak długotrwałe stosowanie NRTI wiąże się z efektami ubocznymi, takimi jak zaburzenia metabolizmu lipidów i rozwój zaburzeń neurokognitywnych związanych z redystrybucją tkanki tłuszczowej, co może prowadzić do wzrostu poziomu wolnych kwasów tłuszczowych (FFA, *ang. free fatty acid*) w osoczu krwi i potencjalnie w płynie mózgowo-rdzeniowym, a także przyczyniać się do rozwoju lipotoksycznych zaburzeń metabolicznych w OUN.

Lipotoksyczność jest określana jako zespół nieprawidłowości metabolicznych wynikających ze zwiększonego stężenia FFA w osoczu krwi i ich nagromadzenia w komórkach tkanek innych niż tłuszczowe. Proces ten najczęściej dotyczy komórek trzustki, wątroby, mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego lub nerek. Wśród zaburzeń molekularnych wywoływanych przez nadmierną akumulację FFA wymienia się stres oksydacyjny, stres retikulum endoplazmatycznego, indukcję insulinooporności (IR, *ang. insulin resistance*) czy stan zapalny. Zjawisko lipotoksyczności jest stosunkowo dobrze opisane w komórkach wyżej wymienionych narządów, podczas gdy istnieje bardzo niewiele badań dotyczących wpływu lipotoksyczności na komórki układu nerwowego. Istnieją jedynie nieliczne doniesienia o lipotoksyczności w tkankach nerwowych, astrocytarnych i mikrogleju układu nerwowego, a także na temat potencjalnego udziału lipotoksyczności w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimerera (AD, *ang. Alzheimer's disease*) i choroba Parkinsona (PD, *ang. Parkinson's disease*).

Istnieje luka w wiedzy na temat bezpieczeństwa leków antyretrowirusowych i ich wpływu na toksyczność lipidów w OUN oraz indukowanie zaburzeń w OUN w związku ze stosowaną terapią u pacjentów zakażonych HIV. Aby odpowiedzieć na to zapotrzebowanie, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu lamiwudyny i zydowudyny, na homeostazę lipidów, funkcję mitochondriów i indukowanie insulinooporności w badaniach modelowych na dwóch liniach komórkowych – linii komórek dopaminergicznych SH-SY5Y i linii komórek mikrogleju HMC3. Komórki inkubowano z 3TC i AZT w stężeniach odpowiadających stężeniom terapeutycznym w osoczu krwi (odpowiednio 10 μ M i 6 μ M), a także z dwoma stężeniami kwasu palmitynowego (PA, *ang. palmitic acid*) - 200 μ M i 500 μ M, które odzwierciedlają fizjologiczne oraz podwyższone stężenia tego kwasu tłuszczowego w osoczu krwi. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano kwas dokozaheksaenowy (DHA, *ang. docosahexaenoic acid*). Wyniki pomiarów odnoszono do komórek kontrolnych, które nie zostały poddane działaniu żadnej z badanych substancji. Uzyskane wyniki poddano analizie statystyczną w celu zweryfikowania istotności statystycznej zaobserwowanych zmian.

Aby zbadać metabolizm lipidów oceniono ekspresję dwóch transporterów kwasów tłuszczowych - białka wiążącego kwasy tłuszczowe 4 i 5 (FABP4, FABP5, *ang. fatty acid-binding protein 4, 5*), a także zawartość lipidów w komórkach. Funkcję mitochondriów określono poprzez ocenę poziomu anionorodnika ponadtlenkowego i adenozyno-5'-trifosforanu (ATP, *ang. adenosine triphosphate*). Rozwój insulinooporności mierzono na drodze oceny ekspresji receptora insuliny (InsR, *ang. insulin receptor*), substratu receptora insuliny 1 (InsRS1, *ang. insulin receptor substrate 1*) oraz poziomów fosforylacji kinazy 3'-fosfatydiloinozytolu (PI3K, *ang. phosphoinositide 3-kinases*). Dodatkowo wykonano pomiar aktywności kinaz białkowych aktywowanych mitogenami, N-końcowej kinazy czynnika transkrypcyjnego c-Jun (JNK, *ang. c-Jun N-terminal kinase*), kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK, *ang. extracellular signal-regulated kinase*) i kinazy p38, kluczowych elementów szlaków sygnałowych komórki w odpowiedzi na czynniki stresorowe. Kinazy te zostały wybrane jako uzupełnienie oceny rozwoju insulinooporności ze względu na fakt, że mają również udział w szlaku sygnałowym insuliny.

Na drodze przeprowadzonych badań wykazano, że 3TC, AZT, a także PA, przyczyniły się do obniżenia wewnątrzkomórkowych stężeń FABP4 i FABP5, zarówno w komórkach mikrogleju, jak i neuronach dopaminergicznych. Zaobserwowano odmienny wpływ badanych NRTI na zawartość lipidów w komórce. Zarówno 3TC, jak i AZT zwiększyły zawartość lipidów w komórkach mikrogleju, podczas gdy w neuronach dopaminergicznych

zaobserwowano ich spadek. Zmniejszenie zawartości lipidów nastąpiło również po inkubacji komórek neuronów dopaminergicznych z oboma stężeniami PA. Dodatkowo, badane NRTI wywołały wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach w obu liniach komórkowych, w przeciwieństwie do PA, który przyczynił się do zmniejszenia poziomu tej reaktywnej formy tlenu (ROS, *ang. reactive oxygen species*). Wykazano również, że inkubacja z AZT powoduje spadek stężenia ATP w mitochondriach w komórkach mikrogleju. Badane leki nasilały również proces fosforylacji kinazy ERK. Zmiany wywołane przez 3TC i AZT w linii komórkowej neuronów dopaminergicznych obejmowały również zwiększenie poziomu fosforylacji PI3K i mniejszą ekspresję receptora insuliny. Efekt wywołany przez PA na InsR również obejmował spadek ekspresji, podczas gdy poziom fosforylacji PI3K uległ zmniejszeniu pod wpływem tego kwasu tłuszczowego.

Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że 3TC i AZT nie przyczyniają się w istotny sposób do rozwoju procesów neurodegeneracyjnych ani lipotoksycznych zaburzeń metabolicznych za pośrednictwem transporterów kwasów tłuszczowych ani na drodze rozwoju insulinooporności. Wpływ badanych NRTI na zawartość lipidów w komórkach układu nerwowego różni się w zależności od typu komórki. W świetle uzyskanych wyników można jednak przypuszczać, że dochodzi do rozwoju zaburzeń neurodegeneracyjnych pod wpływem NRTI w komórkach raczej poprzez zaburzenie funkcji mitochondriów i indukcję stresu oksydacyjnego. Co zaskakujące, w obszarze przeprowadzonych badań nie wykazano negatywnego wpływu PA na funkcję komórek mikrogleju i neuronów dopaminergicznych, nie potwierdzając jego właściwości do indukowania zaburzeń neurodegeneracyjnych. Przypuszczalnie komórki wybrane do badań modelowych charakteryzują się większą odpornością na lipotoksyczne efekty zwiększonych stężeń PA w odniesieniu do innych typów komórek i tkanek. Jednakże konieczne byłoby wykonanie dodatkowych badań, aby móc potwierdzić takie przypuszczenie. Podsumowując, w oparciu o badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, wykazano możliwy udział NRTI w patogenezie zaburzeń neurodegeneracyjnych w OUN na drodze indukcji zaburzeń funkcji mitochondriów, natomiast nie potwierdzono założenia o neurodegeneracyjnych właściwościach PA.

Summary

Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection is a global health problem affecting millions of people worldwide. The effectiveness of treatment for HIV-infected patients has improved significantly, and life expectancy has been significantly extended thanks to the development of numerous therapeutic strategies over the past few decades, but comorbidities have been observed that reduce the quality of life of such individuals. In addition, despite therapy, some areas of the body, including the central nervous system (CNS), remain susceptible to ongoing viral replication, acting as a reservoir and preventing complete viral eradication.

Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) remain key in the treatment of HIV, and the most important drugs in this group include abacavir, lamivudine (3TC), zidovudine (AZT) and tenofovir. However, long-term use of NRTIs is associated with side effects such as lipid metabolism disorders and the development of neurocognitive impairment associated with fat redistribution, which can lead to increased levels of free fatty acids (FFAs) in plasma and potentially in cerebrospinal fluid, as well as contributing to the development of lipotoxic metabolic disorders in the CNS.

Lipotoxicity is defined as a set of metabolic abnormalities resulting from increased plasma concentrations of FFAs and their accumulation in cells of non-adipose tissues. This process most often involves cells of the pancreas, liver, skeletal muscle, heart muscle or kidney. Among the molecular disorders induced by excessive FFA accumulation are oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, induction of insulin resistance (IR) or inflammation. The phenomenon of lipotoxicity is relatively well described in cells of the above-mentioned organs, while the studies on the effects of lipotoxicity on cells of the nervous system are conducted to a much lesser extent. There are only a few reports on lipotoxicity in neural, astrocytic and microglia tissues of the nervous system, as well as on the potential involvement of lipotoxicity in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD).

There is a gap in knowledge about the safety of antiretroviral drugs and their effects on CNS lipid toxicity and induction of CNS abnormalities due to therapy in HIV-infected patients. To address this need, the purpose of this dissertation was to study the effects of lamivudine and zidovudine, on lipid homeostasis, mitochondrial function and induction of insulin resistance in model studies on two cell lines - the SH-SY5Y dopaminergic cell line and the HMC3 microglia

cell line. The cells were incubated with 3TC and AZT at concentrations corresponding to therapeutic plasma concentrations (10 μ M and 6 μ M, respectively), as well as with two concentrations of palmitic acid (PA) - 200 μ M and 500 μ M, which reflect physiological and elevated plasma concentrations of this fatty acid. Docosahexaenoic acid (DHA) was used as a positive control. The results of the measurements were related to control cells, which were not treated with any of the test substances. The results were subjected to statistical analysis to verify the statistical significance of the observed changes.

To study lipid metabolism, the expression of two fatty acid transporters, fatty acid-binding proteins 4 and 5 (FABP4, FABP5), and cellular lipid content were assessed. Mitochondrial function was determined by assessing the levels of superoxide anion radical and adenosine 5'-triphosphate (ATP). The development of insulin resistance was measured by assessing the expression of insulin receptor (InsR), insulin receptor substrate 1 (InsRS1), and phosphorylation levels of phosphoinositide 3'-phosphatidylinositol kinase (PI3K). In addition, the measurement of the activity of mitogen-activated protein kinases was conducted. Selected proteins included c-Jun transcription factor N-terminal kinase (JNK, or c-Jun N-terminal kinase), extracellular signal-regulated kinase (ERK, or extracellular signal-regulated kinase) and p38 kinase, key components of cell signaling pathways in response to stressors. These kinases were chosen to supplement the assessment of the development of insulin resistance due to the fact that they are also involved in the insulin signaling pathway.

By way of the study, it was shown that 3TC, AZT, as well as PA, contributed to the reduction of intracellular concentrations of FABP4 and FABP5, both in microglia cells and dopaminergic neurons. Different effects of the tested NRTIs on cellular lipid content were observed. Both 3TC and AZT increased lipid content in microglia cells, while a decrease was observed in dopaminergic neurons. A decrease in lipid content also occurred after incubation of dopaminergic neuron cells with both concentrations of PA. In addition, the tested NRTIs induced an increase in the level of superoxide anion radical in mitochondria in both cell lines, in contrast to PA, which contributed to a decrease in the level of this reactive oxygen species (ROS). It was also shown that incubation with AZT causes a decrease in the concentration of ATP in mitochondria in microglia cells. The pharmaceuticals also enhanced the phosphorylation of ERK kinase. The changes induced by 3TC and AZT in the dopaminergic neuron cell line also included an increase in PI3K phosphorylation and a decrease in insulin receptor expression. The PA-induced effect on InsR also included a decrease in expression, while the level of PI3K phosphorylation was reduced under the influence of this fatty acid.

The results may indicate that 3TC and AZT do not significantly contribute to neurodegenerative processes or lipotoxic metabolic disorders via the influence on fatty acid transporters or through the development of insulin resistance. The effect of the studied NRTIs on the lipid content of cells in the nervous system varies depending on the cell type. However, in view of the results obtained, it can be assumed that NRTI-mediated neurodegeneration develops in cells through disruption of mitochondrial function and induction of oxidative stress. Surprisingly, in the area of the conducted studies, PA did not show negative effects on the function of microglia cells and dopaminergic neurons, not allowing the confirmation of its neurodegenerative properties. Presumably, the cells selected for the model studies are characterized by greater resistance to the lipotoxic effects of increased concentrations of PA in relation to other cell types and tissues. However, additional studies should be performed to be able to confirm this supposition. In conclusion, based on the studies conducted within the framework of this dissertation, the possible involvement of NRTIs in the pathogenesis of neurodegenerative disorders in the CNS through the induction of mitochondrial dysfunction has been demonstrated, while the assumption of neurodegenerative properties of PA has not been confirmed.