

Abstract

Epilepsy is a widespread neurological disorder affecting millions worldwide, with temporal lobe epilepsy (TLE) being its most common drug-resistant form. Current treatments primarily target neuronal excitability, neglecting the significant contributions of glial cells, particularly astrocytes, in epilepsy progression. CD44, a cell-surface glycoprotein involved in cell adhesion, neuroinflammation, and synaptic plasticity, is highly upregulated in epilepsy models. This thesis investigates the role of astrocytic CD44 in epileptogenesis, aiming to elucidate its involvement in seizure development, hippocampal structural remodeling, and synaptic alterations. The central research question addresses whether astrocytic CD44 contributes to TLE's pathophysiological changes and whether its modulation could influence disease progression.

To explore this question, an astrocyte-specific CD44 knockout mouse model was generated using the Cre-loxP system. The kainate (KA) model of temporal lobe epilepsy was employed to induce *status epilepticus*, replicating TLE-like pathologies. Advanced methodologies were applied, including immunohistochemistry for assessing reactive astrogliosis, mossy fiber sprouting and granule cell dispersion, Western blot analysis for protein expression, and serial block-face electron microscopy (SBEM) for high-resolution examination of synaptic ultrastructure. Electroencephalographic (EEG) recordings further characterized seizure patterns and severity in CD44-depleted mice compared to controls. This comprehensive approach enabled the assessment of astrocytic CD44's role across molecular, cellular, and systemic levels in epileptogenesis.

The thesis findings demonstrate that astrocytic CD44 deletion influences both seizure patterns and hippocampal remodeling in a KA-induced model of TLE. Specifically, CD44-deficient mice showed a reduction in the frequency of behavioral seizures but an increase in electrographic non-convulsive episodes detectable only via EEG. While CD44 deletion did not significantly affect the latency to the first spontaneous seizure or the severity of convulsive seizures, it reduced hallmark structural changes of epileptogenesis, including reactive astrogliosis, mossy fiber sprouting, and granule cell dispersion. SBEM analyses showed increased dendritic spine number, reduced postsynaptic density size, and decreased astrocytic ensheathment in the CD44-depleted epileptic brain compared to controls. These findings underscore the essential role of astrocytic CD44 in preserving synaptic integrity and stability during epileptic insults.

These results suggest that astrocytic CD44 plays a pivotal role in hippocampal remodeling and seizure propagation. By attenuating pathological astrocyte responses, CD44 deletion may mitigate some of the structural changes associated with TLE, positioning CD44 as a potential therapeutic target. This work underscores the importance of astrocyte-driven mechanisms in epilepsy and advocates for a broader perspective in designing future treatments, integrating neuronal and glial contributions to disease progression.

Streszczenie

Epilepsja to powszechne zaburzenie neurologiczne dotykające miliony ludzi na całym świecie, z czego jej najczęstszą, lekooporną postacią jest padaczka skroniowa (TLE). Obecne metody leczenia koncentrują się głównie na regulacji pobudliwości neuronalnej, pomijając istotny wkład komórek glejowych, szczególnie astrocytów, w progresję epilepsji. CD44, glikoproteina powierzchniowa biorąca udział w adhezji komórek, procesach neurozapalnych i plastyczności synaptycznej, wykazuje znacznie zwiększony poziom regulacji pozytywnej w modelach padaczki. Niniejsza rozprawa doktorska bada rolę astrocytarnego CD44 w epileptogenezie, mając na celu wyjaśnienie jego udziału w rozwoju napadów padaczkowych, przebudowie hipokampa oraz zmianach w ultrastrukturze synaptycznej. Kluczowym jest pytanie czy astrocytarne CD44 przyczynia się do zmian patologicznych obserwowanych w TLE oraz czy jego modulacja może wpływać na przebieg choroby.

Aby zbadać to zagadnienie opracowano model myszy z delecją CD44 w astrocytach przy użyciu systemu Cre-loxP. Do indukcji stanu padaczkowego wykorzystano model padaczki skroniowej wywołanej iniekcją kwasu kainowego odtwarzając patologie charakterystyczne dla TLE. W badaniach zastosowano zaawansowane metody, takie jak immunohistochemię do oceny reaktywnej astroglejozy, bocznicowania włókien kiciastych i rozproszenia komórek ziarnistych, analizę Western blot do badania poziomu ekspresji białek oraz mikroskopię elektronową metodą seryjnych skrawków (SBEM) do obrazowania ultrastruktury synaptycznej w wysokiej rozdzielczości. Dodatkowo, rejestracje elektroencefalograficzne (EEG) pozwoliły na charakterystykę wzorców i nasilenia napadów u myszy pozbawionych CD44 w astrocytach. To kompleksowe podejście umożliwiło ocenę roli astrocytarnego CD44 na poziomie molekularnym, komórkowym i systemowym w epileptogenezie.

Wyniki pracy wykazały, że delecja CD44 w astrocytach wpływa na wzorce napadów oraz przebudowę hipokampa w modelu padaczki skroniowej wywołanej iniekcją kwasu kainowego. Myszy pozbawione CD44 wykazywały zmniejszoną częstotliwość napadów behawioralnych, ale zwiększoną liczbę napadów elektrograficznych, niekonwulsyjnych wykrywalnych tylko za pomocą EEG. Chociaż delecja CD44 nie miała znaczącego wpływu na czas do pierwszego spontanicznego napadu ani na nasilenie dotkliwości napadów konwulsyjnych, to zmniejszyła charakterystyczne zmiany strukturalne związane z epileptogenezą – reaktywną astroglejozę, bocznicowanie włókien kiciastych oraz rozproszenie komórek ziarnistych. Analizy SBEM ujawniły zwiększoną liczbę kolców dendrytycznych, zmniejszony obszar zajmowany przez białka gęstości postsynaptycznej oraz obniżenie stopnia okalania synaps przez astrocyty w mózgu myszy z deficytem CD44 w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki te podkreślają kluczową rolę astrocytarnego CD44 w zachowaniu integralności i stabilności synaptycznej podczas napadów epileptycznych.

Przedstawione wyniki dowodzą, że astrocytarny CD44 odgrywa kluczową rolę w procesach przebudowy hipokampa oraz reaktywnej astrogliozy podczas epileptogenezy. Sugerują one, że delecja CD44 może łagodzić niektóre zmiany strukturalne związane z TLE, czyniąc CD44 potencjalnym celem terapeutycznym. Badania te podkreślają znaczenie mechanizmów regulowanych przez astrocyty w kontekście epilepsji i wskazują na konieczność szerszego podejścia do projektowania przyszłych terapii, uwzględniających zarówno neuronowe, jak i glejowe aspekty progresji choroby.