Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN
Zakład Neurochemii
Pracownia Farmakoneurochemii

Marcin Gamdzyk

Hiperbaria tlenowa oraz postkondycjonowanie łagodną hipoksją hipobaryczną jako strategie terapeutyczne w doświadczalnym modelu asfiksji okołoporodowej

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

dr hab. n. med. Elżbiety Salińskiej

Warszawa, 2016

Streszczenie

Okołoporodowa hipoksja-ischemia (H-I) uznawana jest za duży problem współczesnej neonatologii. Konsekwencją przebytej H-I jest w różnym stopniu nasilona encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna (ENN). Statystyki pokazują, że w krajach wysoko rozwiniętych ENN stwierdza się u 2-4 na 1000 żywo urodzonych, donoszonych noworodków. W ciężkiej postaci, na skutek znacznych zaburzeń w rozwoju bądź śmierci mózgowej, dochodzi do zgonu dziecka. W sytuacji długotrwale utrzymującej się H-I, dochodzi do zaburzeń rozwoju z mózgowym porażeniem dziecięcym, zaburzeniami poznawczymi lub/i padaczką włącznie. Wiadomo, że odroczonym skutkiem przebytych komplikacji okołoporodowych mogą być zaburzenia funkcji poznawczych, pamięci i niepełnosprawność intelektualna.

Powszechnie stosowanym eksperymentalnym modelem ENN jest model H-I siedmiodniowych szczurów. Symuluje on patologię neuronów na poziomie molekularnym, występującą w przebiegu ENN. Na skutek H-I dochodzi do zaburzenia metabolizmu energetycznego komórek, spada produkcja ATP, pojawia się kwasica, a w konsekwencji w nadmiarze uwalniany jest glutaminian. Wzrost stężenia glutaminianu powoduje nadmierną aktywację receptorów NMDA, które są receptorami glutaminianergicznymi sprzężonymi z kanałem wapniowym przepuszczalnym dla Ca^{2+}. Nadmierne pobudzenie receptorów NMDA wiąże się z napływem jonów wapnia do komórek nerwowych, co indukuje ekscytotoksyczne zmiany zwyrodnieniowe o charakterze nekrotyczno-apoptotycznym. Konsekwencją powyższych zdarzeń jest uszkodzenie mitochondriów, pojawienie sie stresu oksydacyjnego i śmierć neuronów. Rozwija się zapalenie i obrzęk mózgu, a obraz dopełnia uszkodzenie bariery krew-mózg.

Stres oksydacyjny jest niezwykle ważnym elementem patogenezy wywołanego przez niedokrwienie uszkodzenia komórek nerwowych. W normalnych warunkach, mechanizmy obronne komórek, które utrzymują niski poziom reaktywnych form tlenu (RFT), zapobiegają stresowi oksydacyjnemu. Jednak podczas hipoksji-ischemii rodniki tlenowe są produkowane w nadmiarze, nie są odpowiednio neutralizowane i usuwane, przez co osiągają stężenia toksyczne, co skutkuje zaburzeniami funkcji komórkowych oraz uszkodzeniem błon lipidowych, białek i DNA. Komórkowy system ochrony przed RFT stanowią przede wszystkim glutation oraz enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) i katalaza. SOD, występująca u ssaków w trzech głównych

formach: cytoplazmatycznej cynkowo-miedziowej (SOD1), mitochondrialnej manganowej (SOD2) oraz zewnątrzkomórkowej cynkowo-miedziowej (SOD3), katalizuje reakcję przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) do nadtlenku wodoru (H_2O_2) i tlenu cząsteczkowego. Z kolei enzymami odpowiedzialnymi za utrzymanie niskich stężeń toksycznego w wysokich stężeniach nadtlenku wodoru w komórkach są GPx i katalaza. Glutation bierze udział w detoksykacji nadtlenku wodoru, nadtlenków organicznych i innych reaktywnych form tlenu oraz w odtwarzaniu uszkodzonych w procesach peroksydacyjnych składników komórki.

Podobnie jak w przypadku udaru mózgu, poszukiwania skutecznych terapii neuroprotekcyjnych dla ENN wciąż nie przynoszą sukcesu i do tej pory, poza hipotermią, nie ma innych terapii czy leków, które mogłyby być z powodzeniem stosowane w klinice neonatologicznej. W związku z tym, uwaga eksperymentatorów w większym stopniu skupia się na metodach alternatywnych, wywołujących pewną tolerancję mózgu na H-I. Do takich alternatywnych form terapii zalicza się hiperbarię tlenową (HBO) oraz postkondycjonowanie łagodną hipoksją hipobaryczną (HH).

W poprzednich latach wykazano, że zastosowanie nieuszkadzającego stresora w mózgu - na przykład krótkiego łagodnego epizodu niedokrwienia po uszkadzającym niedokrwieniu mózgu - może mieć działanie neuroprotekcyjne. Zjawisko to nazwano postkondycjonowaniem i do tej pory nie zdefiniowano mechanizmów nim rządzących. Znane są protekcyjne właściwości postkondycjonowania hipoksyjnego *in vitro* oraz *in vivo* w niedokrwieniu mięśnia sercowego. Podobne nadzieje są wiązane z postkondycjonowaniem hipoksyjnym mózgu. Postkondycjonowanie przypadków udaru mózgu czy asfiksji okołoporodowej nieuszkadzającą ischemią lub klasyczną hipoksją może być, ze zrozumiałych przyczyn, trudne do wprowadzenia w praktyce klinicznej. Dlatego w opisanych w tej rozprawie badaniach zastosowano postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną (HH) - stwarzając warunki zmniejszonego ciśnienia tlenu porównywalne do warunków panujących na wysokości 5000 m n.p.m., lub 10% zawartości tlenu w warunkach normobarycznych - powodującą względnie łagodne niedotlenienie.

Drugą alternatywną formą terapii stosowaną w tej pracy jest tlenowa terapia hiperbaryczna (HBO). HBO polega na zastąpieniu wdychanego powietrza tlenem podawanym pod zwiększonym ciśnieniem. Hiperbaryczna terapia tlenowa stosowana jest obecnie najczęściej w leczeniu zatrucia tlenkiem węgla, oparzeń, trudno gojących się ran, zatorów gazowych oraz nagłego niedosłuchu. Neuroprotekcyjne działanie hiperbarii tlenowej zostało

wykazane w wielu badaniach na doświadczalnych modelach całkowitego niedokrwienia mózgu u różnych gatunków zwierząt, jednak ze względu na nieujednolicone procedury, raporty kliniczne nie dają jednoznacznej odpowiedzi, co do efektu protekcyjnego.

Dane z literatury fachowej wskazują na neuroprotekcyjne działanie zarówno HBO jak i HH w niedokrwieniu mózgu u dojrzałych zwierząt oraz niedotlenieniu okołoporodowym, jednak mechanizm tego zjawiska jest wciąż niejasny i pozostaje obiektem badań. Są przesłanki uzasadniające hipotezę roboczą, że jednym z mechanizmów neuroprotekcyjnego działania HBO i HH może być działanie modulujące stres oksydacyjny wywołany przez H-I.

Celem podjętych badań było:

• określenie neuroprotekcyjnego potencjału HBO oraz postkondycjonowania HH w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów

• zbadanie parametrów stresu oksydacyjnego, którego złagodzenie może być jednym z potencjalnych mechanizmów neuroprotekcyjnego działania HBO oraz postkondycjonowania HH w H-I mózgu osesków szczura.

Neuroprotekcyjne działanie HBO i HH określono na podstawie oceny ich wpływu na uszkodzenie mózgu osesków szczurzych poddanych modelowej ENN, oraz na zachowanie się zwierząt po przebytej hipoksji - ischemii. Behawior zwierząt badano w teście otwartego pola. W celu oceny wpływu HBO oraz HH na spowodowane przez HI zmiany parametrów stresu oksydacyjnego postanowiono zbadać: wzrost syntezy RFT, zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, katalaza) oraz zmiany poziomu GSH. Dodatkowo zbadano ekspresję białek SOD1 oraz SOD2 w homogenatach pochodzących z mózgu szczurów poddanych zabiegom HBO lub HH.

Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno terapia HBO jak i postkondycjonowanie HH znacząco zmniejszają uszkodzenia mózgu wywołane H-I. Neuroprotekcyjny efekt działania badanych zabiegów manifestował się poprzez zmniejszenie ubytku masy półkuli ipsilateralnej oraz zmniejszenie powierzchni martwicy mózgu. Ponadto HBO oraz HH częściowo zapobiegły zmianom morfologicznym hipokampa uwidocznionym przy pomocy barwienia fioletem krezylu. Zarówno HBO jak i HH zmniejszały poziom dezorganizacji neuronów w sektorze CA1 hipokampa oraz znacząco zmniejszały ubytki komórek w korze mózgowej. Dodatkowo oba testowane podejścia terapeutyczne hamowały śmierć komórek na drodze

apoptozy i nekrozy po przebytej H-I. W badanym oknie terapeutycznym, do 6 godzin po H-I, testowane postępowania skutkowały neuroprotekcją. Jednak w przypadku postkondycjonowania HH najlepsze rezultaty dawało rozpoczęcie terapii 1 godzinę po H-I. W przypadku HBO opóźnienie rozpoczęcia terapii miało mniejszy wpływ na jej skuteczność niż w przypadku HH.

HBO i HH zastosowane po H-I poprawiły niektóre parametry lokomotoryczne u szczurów w teście otwartego pola. Szczury poddane H-I przebyły krótszy dystans oraz były w sposób istotny statystycznie mniej ruchliwe niż zwierzęta z grupy kontrolnej. Poddanie szczurów HBO 1 godzinę po H-I skutkowało zwiększeniem przebytego dystansu oraz przywróceniem ruchliwości do poziomu zwierząt kontrolnych. Zmiany te były statystycznie znamienne w stosunku do parametrów zanotowanych dla zwierząt nie poddanych żadnej terapii. Postkondycjonowanie HH również poprawiało niektóre parametry lokomotoryczne szczurów, jednak w przypadku postkondycjonowania HH istniało mniejsze przełożenie neuroprotekcji odkrytej w badaniach morfologicznych i biochemicznych na neuroprotekcję funkcjonalną.

Zastosowanie zarówno HBO jak i postkondycjonowania HH zmniejszyło obserwowany po H-I wzrost poziomu RFT w półkuli ipsilateralnej. Po H-I odnotowano wzrost aktywności SOD, wskazujący na obronną reakcję organizmu. Zastosowanie HH skutkowało dalszym wzrostem aktywności SOD, co prawdopodobnie pozwoliło na szybszą neutralizację RFT. Natomiast zastosowanie HBO zmniejszyło aktywność SOD, co, wobec obserwowanych efektów neuroprotekcyjnych, może wskazywać na mniejszą produkcję RFT. Przy pomocy metody western blot zbadano wpływ zastosowanych terapii na zaobserwowane po H-I zmiany ekspresji dwóch izoform SOD. Zbadano ekspresję cytoplazmatycznej izoformy SOD1 oraz izoformy mitochondrialnej SOD2. W mózgach zwierząt poddanych H-I zaobserwowano około 3,5-krotny wzrost ekspresji białka SOD1 w półkulach ipsilateralnych względem grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano zmian ekspresji w półkulach kontralateralnych. U zwierząt, u których zastosowano HBO począwszy od 1, 3 lub 6 godziny po H-I, ekspresja białka SOD1 w porównaniu do zwierząt niepoddanych żadnej terapii zdecydowanie malała. U zwierząt, które po H-I poddano sesjom HH nie zanotowano istotnych statystycznie zmian w ekspresji SOD1. W mózgach zwierząt poddanych H-I zaobserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji białka SOD2 w półkulach ipsilateralnych, o 25% względem grupy kontrolnej. Zastosowanie terapii HBO po H-I powodowało częściowy powrót ekspresji białka SOD2 do poziomu grupy kontrolnej, w konsekwencji ekspresja SOD2 nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy

kontrolą a grupami poddanymi działaniu HBO. Efekt ten był taki sam, niezależnie od czasu rozpoczęcia terapii. Poddanie zwierząt postkondycjonowaniu HH począwszy od 1, 3 lub 6 godziny po przebytej H-I spowodowało znamienny statystycznie wzrost ekspresji SOD2 w każdej z tych grup, w porównaniu do grupy H-I. Obserwowany wzrost aktywności SOD po zastosowaniu HH prawdopodobnie wiąże się ze zwiększoną ekspresją SOD2, co wskazuje na istotną rolę tego enzymu w mechanizmie neuroprotekcji po zastosowaniu HH.

Zastosowanie zarówno HBO jak i HH przywróciło wyjściowy poziom stężenia GSH w półkulach ipsilateralnych po H-I. Glutation jest substratem dla reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową. HH zastosowana 1 godzinę po H-I dodatkowo podwyższała aktywność peroksydazy glutationowej, jednak nie był to wynik znamienny statystycznie. Z kolei HBO skutkowało niewielkim spadkiem aktywności tego enzymu. H-I skutkowała podwyższeniem aktywności katalazy w półkulach ipsilateralnych. Zastosowanie postkondycjonowania HH nie zmieniało podwyższonej aktywności katalazy, natomiast poddanie zwierząt HBO skutkowało obniżeniem aktywności katalazy, co ponownie wskazuje na odmienne mechanizmy działania zastosowanych terapii.

Te dane pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- terapia HBO oraz postkondycjonowanie HH posiadają podobny potencjał neuroprotekcyjny w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów
- jednym z mechanizmów neuroprotekcyjnego działania HBO i HH może być działanie zmniejszające stres oksydacyjny wywołany przez H-I:

  -neuroprotekcyjne działanie HH prawdopodobnie związane jest z szybszym i efektywniejszym neutralizowaniem RFT, osiąganym przez dodatkowe uaktywnienie enzymów antyoksydacyjnych - SOD i GPx

  -neuroprotekcyjne działanie HBO może być związane z mechanizmami redukującymi powstawanie RFT w mózgu po H-I - objawem tego jest obserwowany spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych, przy równoczesnym zmniejszeniu uszkodzenia mózgu.

Abstract

Perinatal hypoxia-ischemia (HI) is considered to be a fundamental problem of neonatology. HI may lead to hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). Statistics show that even in developed countries HIE is diagnosed in 2-4 per 1000 live birth, full-term newborns. In severe cases, as a result of significant developmental disorders and brain damage, HIE may lead to death of the newborn. Long lasting HI can result in cerebral palsy, cognitive impairment and epilepsy. It is well documented, that the delayed effects of perinatal complications may include impaired cognitive and intellectual function and memory problems.

Seven day old rat HI model is a widely used experimental model of HIE. It simulates neurons pathology at the molecular level, which occurs during HI. HI results in abnormal energy metabolism, decrease of ATP production, acidosis, and consequently excessive release of glutamate. Increased concentration of glutamate causes excessive activation of NMDA receptors, which are glutamatergic receptors coupled with calcium channel permeable to Ca^{2+}. Overstimulation of NMDA receptors is associated with the influx of calcium ions into the nerve cells, which induces excitotoxic degeneration of a necrotic/apoptotic character. Consequences of these events include mitochondrial damage, oxidative stress and neuronal death. In turn inflammation, brain edema and damage to the blood-brain barrier develop.

Oxidative stress is a very important component of ischemia-induced pathogenesis of neuronal cells. Under normal conditions, the defensive mechanisms of the cell that maintain low concentration of reactive oxygen species (ROS) prevent oxidative stress. However, during hypoxia-ischemia, oxygen radicals are produced in excess, they are not adequately neutralized and removed. Thereby they reach toxic concentrations, resulting in cellular dysfunction and damage to lipid membranes, proteins and DNA. Natural protection against ROS is guaranteed by glutathione and antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase. SOD, which is present in mammalian cells in three major forms: cytoplasmic copper-zinc (SOD1), mitochondrial manganese (SOD2) and extracellular copper-zinc (SOD3), catalyzes the conversion of superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen. GPx and catalase are enzymes responsible for maintaining low hydrogen peroxide levels, which is toxic in high concentrations. Glutathione is involved in the

detoxification of hydrogen peroxide, organic peroxides and other reactive oxygen species and in regeneration of damaged cell components.

Likewise in the case of stroke, seek for effective, pharmacological therapy for hypoxia-ischemia is thus far unsuccessful. Apart from hypothermia, no other treatments or drugs that can be successfully used in neonatal clinic are known. Therefore, efforts of some experimenters have switched towards alternative methods, which induce brain tolerance for HI. These alternative methods include hyperbaric oxygen therapy (HBO) and mild hypobaric hypoxia postconditioning (HH).

In the past, it was shown that applying non damaging stressor to the brain - such as brief episode of mild ischemia after initial, damaging cerebral ischemia - might have a neuroprotective effect to the brain. This phenomenon is called postconditioning and so far mechanisms governing it had not been well defined. Protective properties of hypoxic postconditioning *in vitro* and *in vivo* in myocardial ischemia were reported. Similar hopes are associated with hypoxic postconditioning of the brain. Postconditioning of stroke or perinatal asphyxia patients with non damaging ischemia, or even with classic hypoxia may be, for obvious reasons, difficult, if not impossible to implement in clinical settings. Therefore, in this study hypobaric hypoxia postconditioning (HH) was used. Conditions of reduced oxygen pressure were created, comparable to conditions at an altitude of 5000 m above sea level, or 10% normobaric concentration of oxygen, which caused relatively mild hypoxia.

Second alternative form of therapy used in this study was hyperbaric oxygen therapy (HBO). HBO is defined as breathing 100% oxygen at a pressure higher than atmospheric pressure. Hyperbaric oxygen therapy is currently used mostly for the treatment of carbon monoxide poisoning, burns, wounds difficult to heal, gas embolism and sudden hearing loss. Neuroprotective effect of HBO has been shown in many studies in experimental models of global cerebral ischemia in different animals, but due to the non-standardized procedures, clinical reports do not give a definite conclusion about HBO protective effect.

Data obtained from the literature suggests, that both HBO and HH have a neuroprotective effect in cerebral ischemia in mature animals and in perinatal hypoxia, but the mechanism of this phenomenon is still unclear and is the subject of research. Working hypothesis states that one of the mechanisms of neuroprotective action of HBO and HH can be associated with modulating effect of oxidative stress induced by HI.

The aim of the research was to:

• determine neuroprotective potential of HBO and HH in neonatal rat HI model

• examine the parameters of oxidative stress, which can be one of the potential factors of neuroprotective action of HBO and HH in HI model.

The neuroprotective effect of HBO and HH was determined based on their effects on brain damage of rats subjected to HI model, and based on the behavior of the animals that underwent HI. Behavior of animals was tested in the open field test. To evaluate the effect of HBO and HH on oxidative stress caused by HI, ROS production, changes in the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, catalase) and changes of GSH level were measured. Additionally the expression of SOD1 and SOD2 proteins in homogenates from rat brains after HBO or HH exposure was investigated.

The study showed, that both HBO and HH postconditioning significantly reduced brain damage caused by HI. The neuroprotective effect of the tested methods was manifested by reduced weight loss of ipsilateral hemisphere and a reduction of necrosis. HBO and HH partially prevented morphological changes in the hippocampus, which was visualized using cresyl violet staining. Both HBO and HH in part prevented disorganization of neurons in the CA1 region of the hippocampus and significantly reduced cell loss in cerebral cortex. In addition, both of the tested therapeutic approaches inhibited apoptotic and necrotic cell death in hippocampus. In the studied therapeutic window, up to 6 hours after HI, tested procedures resulted in neuroprotection. However, HH postconditioning gave best results when the treatment was initiated 1 hour after HI. Delay of initiation of the therapy had smaller effect on HBO efficacy then it had on HH postconditioning.

HBO and HH improved some parameters of locomotor activity of rats after HI in the open field test. The rats subjected to HI have traveled shorter distance and had statistically significant lower mobility than animals in control group. Subjecting rats to HBO 1 hour after HI resulted in an increase in the distance traveled and restoration of mobility to the level of control animals. These changes were statistically significant in relation to the parameters recorded for animals not subjected to any treatment. HH postconditioning also improved some parameters of locomotor activity in rats, but HBO protection discovered in morphological and biochemical studies was better translated to neuroprotection on functional level than HH.

Use of both HBO and HH decreased ROS level in ipsilateral hemispheres observed in HI animals. HI resulted in increased SOD activity, indicating that a defensive reaction was initiated. Use of HH resulted in further increase in SOD activity, which probably allowed

more efficient neutralization of ROS. However, using HBO decreased SOD activity, which regarding observed neuroprotective effects, may indicate lower production of ROS. Effects of the applied treatments on the observed changes in the expression of two isoforms of SOD were measured using a western blot technique. Expression of cytoplasmic isoform SOD1 and mitochondrial isoform SOD2 was examined. In the brains of animals subjected to HI, approximately 2.5-fold increase in relation to control group in the expression of SOD1 protein in ipsilateral hemispheres was measured. There were no changes in the expression of SOD1 in contralateral hemispheres. In animals that received HBO therapy starting 1, 3 or 6 hours after HI, SOD1 protein level decreased as compared to animals not treated. Animals which were subjected to HH postconditioning after HI sessions had no statistically significant changes in expression of SOD1. Animals subjected to HI had 25% lower level of the SOD2 protein expression in the ipsilateral hemisphere, compared to the control group. This result was statistically significant. Use of HBO after HI resulted in a partial return of SOD2 protein level to the level observed in control group. SOD2 expression did not differ significantly between the control and HBO treated groups. This effect was similar regardless of the time of initiation of the therapy. Exposure of animals to HH starting 1, 3 or 6 hours after HI resulted in a statistically significant increase in the expression of SOD2 in each of these groups, compared to HI group. The observed increase in SOD activity after exposure to HH conditions may be associated with increased expression of SOD2, indicating important role of this enzyme in the mechanism of neuroprotection of HH.

The use of both HBO and HH restored concentrations of GSH in the ipsilateral hemispheres after HI to the baseline levels observed in control animals. Glutathione is a substrate in a reaction catalyzed by glutathione peroxidase. HH applied 1 hour after HI additionally increased the activity of glutathione peroxidase, but it was not a statistically significant result. By contrast, HBO resulted in a slight decrease in the activity of this enzyme. HI resulted in an increase in catalase activity in the ipsilateral hemispheres. The use of HH postconditioning did not alter the increased activity of catalase, and animals that underwent HBO exposure had slightly reduced activity of catalase, which again points to different mechanisms evoked by HBO and HH.

Obtained data allowed for following conclusions:

• HBO and HH have similar neuroprotective potential in neonatal rat HI model

• one of the mechanisms of neuroprotective effects of HBO and HH may be associated with reduction of oxidative stress induced by HI:

-neuroprotective action of HH is probably associated with faster and more efficient neutralization of ROS, achieved through additional activation of antioxidant enzymes - SOD and GPx

-neuroprotective effect of HBO may be related to the mechanisms that reduce formation of ROS in the brain after HI – it is manifested by the observed decrease in antioxidant enzymes activity, accompanied by reduction of brain damage.