

Mgr biol. Łukasz Przykaza

***Potencjał neuroprotekcyny specyficznego agonisty
receptora Y2 neuropeptydu Y
w udarze niedokrwiennym mózgu u szczurów
normotensyjnych i szczurów z genetycznie
uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym SHR***

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Ewa Koźniewska-Kołodziejska
(Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk)

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Helena Domin
(Instytut Farmakologii im. J. Maja Polskiej Akademii Nauk)



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową Instytutu
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława
Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022 r.

Streszczenie

Udar niedokrwienny mózgu jest jednym z głównych problemów zdrowotnych i społeczno-ekonomicznych starzejących się populacji krajów uprzemysłowionych. Najczęściej występującym rodzajem udaru niedokrwiennego mózgu jest udar ogniskowy (85% wszystkich przypadków). Stanowi on trzecią, co do częstości, przyczynę zgonów na świecie. Powyżej 50% osób, które przeżyły ostrą fazę udaru pozostaje niepełnosprawnymi, napotykając trudności w wykonywaniu codziennych czynności.

Mimo wielu lat badań i pozytywnych wyników w zakresie neuroprotekcji, uzyskanych w doświadczeniach na zwierzęcych modelach udaru mózgu, próby przeniesienia tych potencjalnych terapii do leczenia pacjentów po udarze niedokrwiennym nie powiodły się.

Analiza przyczyn niskiego potencjału translacyjnego wyników badań doświadczalnych nad neuroprotekcją w udarze mózgu doprowadziła do wniosku, że badacze nie uwzględniali w dostatecznym stopniu złożoności patofizjologii niedokrwiennej u ludzi i towarzyszących jej chorób.

Badania podstawowe zaowocowały jednak obserwacjami, które umożliwiły lepsze zrozumienie zjawisk zachodzących podczas ostrego niedokrwienia mózgu i zostały potwierdzone także w udarze mózgu u ludzi. Wykazano, że w czasie pierwszych sekund/minut ogniskowego niedokrwienia mózgu obszar niedokrwienny różnicuje się czasowo-przestrzennie na ognisko niedokrwienia (ang. *Infarct core* lub *ischemic core*) i otaczającą je strefę półcienia/penumbry (ang. *Periinfarct penumbra* lub *ischemic penumbra*). W ognisku niedokrwienia w ciągu kilku/kilkunastu minut po udarze następuje nieodwracalne uszkodzenie komórek. Natomiast w strefie półcienia dochodzi do zaburzenia funkcji, a nieodwracalna śmierć komórek następuje znacznie wolniej. Występuje więc okno terapeutyczne – czas w którym zastosowanie odpowiedniej terapii może uratować strefę półcienia, a tym samym zmniejszyć skutki udaru.

Ponadto, zwrócono uwagę na endogenne procesy ochronne i naprawcze w udarze mózgu. Jedną z klas substancji endogennych o potencjalnych właściwościach ochronnych są neuropeptydy, które w warunkach fizjologicznych pełnią rolę kotransmiterów lub neuromodulatorów, a także są aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenie mózgu oraz w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Jednym z nich jest neuropeptyd Y (NPY). W wielu badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że aktywacja receptorów Y2 (Y2R) tego neuropeptydu zmniejsza uwalnianie neuroprzekazników pobudzających – głównych

mediatorów eksytotoksyczności, prowadzącej do śmierci komórek mózgu po niedokrwieniu i w chorobach neurodegeneracyjnych.

Celem badań stanowiących podstawę niniejszej rozprawy była próba wyjaśnienia podłoża neuroprotekcijnego działania specyficznego agonisty receptora Y₂ – C-końcowego fragmentu cząsteczki neuropeptydu Y – NPY(13-36) *in vivo*, w modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu z reperfuzją (ang. *Middle cerebral artery occlusion with reperfusion*, MCAOR), u szczurów normotensyjnych *Sprague-Dawley* (SD) i szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR, ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*). Cele szczegółowe badań obejmowały określenie wpływu NPY(13-36), podanego do komory bocznej mózgu 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji na: i) wielkość obszaru mózgu uszkodzonego w wyniku niedokrwienia/reperfuzji; ii) wybrane parametry chodu i spontaniczną aktywność ruchową; iii) odpowiedź mikroprzepływu krwi w strefie półcienia ischemicznego na wzrost ciśnienia parcjalnego CO₂ we krwi tętniczej i na podanie inhibitora syntazy tlenu azotu; iv) gęstość naczyń mikrokrążenia w strefie półcienia; v) szczelność bariery krew-mózg w naczyniach włosowatych w strefie półcienia ischemicznego.

Badania przeprowadzono na 3-miesięcznych samcach szczurów SD (n = 67) i SHR (n = 62). Pula szczurów w każdym ze szczepów została losowo przydzielona do jednej z 4 grup: grupy SHAM (niedokrwienie pozorowane); grupy kontrolnej (niedokrwienie i podanie do prawej komory bocznej mózgu 6 µl 0,9% NaCl); grupy z NPY(13-36) podanym 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia; grupy z NPY(13-36) podanym 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji. NPY(13-36) był podawany do komory bocznej mózgu w dawce 10 µg (6 µl roztworu w 0,9% NaCl).

Zamknięcie prawej tętnicy środkowej mózgu (90 minut) i reperfuzję przeprowadzono w narkozie wziewnej (70% N₂O/30% O₂/2-2,5% izofluranu). Stopień niedokrwienia był monitorowany za pomocą pomiaru mikroprzepływu krwi w korze mózgowej (LDF, ang. *Laser-Doppler flow*) w ognisku niedokrwienia lub w ognisku i w strefie półcienia ischemicznego. W trzeciej dobie po reperfuzji przeprowadzano testy behawioralne, obejmujące ocenę chodu po bieżni poziomej (test CatWalk 7.1) i spontaniczną aktywność ruchową (test otwartego pola). Wykonanie tych testów po niedokrwieniu lub niedokrwieniu i podaniu NPY(13-36) porównywano z ich wykonaniem przed niedokrwieniem (w przeddzień niedokrwienia wykonywano rejestrację kontrolną). Po 72 godzinach po reperfuzji oceniano też wielkość uszkodzenia mózgu za pomocą barwienia chlorkiem

2,3,5-trifenylo-tetrazoliowym (TTC). Dokonano porównań międzygrupowych pod względem wielkości tego uszkodzenia w ramach szczepów, a także porównania pomiędzy szczepami za pomocą metody metaanalizy. Po upływie 72 godzin po reperfuzji, część zwierząt z każdej grupy i szczepu była perfundowana 4% roztworem paraformaldehydu, ich mózgi pobierane i przygotowywane do oceny w mikroskopie konfokalnym. Przeprowadzono barwienia immunofluorescencyjne przy użyciu przeciwciał dla markera endotelium RECA-1 (badanie gęstości najmniejszych naczyń krwionośnych), oraz immunoglobulin IgG sznurczego osocza (ocena stopnia przeciekania naczyń – detekcja miejsc wynaczynienia IgG). Ocenie poddano naczynia mikrokrążenia w korze mózgowej w obszarze penumbry. W następnej serii doświadczalnej, 24 godziny po reperfuzji oceniano odpowiedzi mikrokrążenia w obszarze penumbry na hiperkapnię (regulacja chemiczna) oraz zablokowanie syntezy tlenu azotu (regulacja podstawowego napięcia naczyń zależna od tlenu azotu). W tych doświadczeniach prowadzono stały pomiar ciśnienia tętniczego krwi metodą bezpośrednią. Do badania regulacji chemicznej zastosowano bodziec w postaci 5% CO₂ dodawanego do mieszaniny gazów oddechowych. W tym samym doświadczeniu, po teście na hiperkapnię i 30 minutach stabilizacji LDF w normokapnii, przeprowadzono test funkcji śródbłonna poprzez ocenę odpowiedzi LDF na dożylne podanie metyloowanej pochodnej L-argininy – L-NAME w dawce 30 mg/kg.

Analizy statystyczne, za wyjątkiem metaanaliz, przeprowadzono z użyciem programu Statistica 8 (StatSoft); stosowano statystyki opisowe, testy t-Studenta oraz analizę wariancji (ANOVA i MANOVA). Metaanalizę przeprowadzono w programie Review Manager 5.3.

Uzyskano następujące wyniki:

1 – spadek LDF w regionie ogniska niedokrwienia (około 80% wartości wyjściowej) podczas 90 minut zamknięcia światła tętnicy środkowej mózgu i jego powrót w czasie reperfuzji były porównywalne w grupie kontrolnej i u szczurów, którym podano NPY(13-36) 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia lub reperfuzji, zarówno u szczurów szczepu SD jak i SHR; 2 – spadek LDF w regionie penumbry wynosił około 30% wartości wyjściowej w grupie kontrolnej szczurów szczepu SD i SHR i utrzymywał się na tym poziomie przez 90 minut niedokrwienia; 3 – podanie NPY(13-36) w trakcie niedokrwienia zmniejszyło statystycznie istotnie spadek LDF w penumbrze (wzrost o 14%) u szczurów SD, co wskazuje na rekrutację naczyń mikrokrążenia; u szczurów szczepu SHR podanie NPY(13-36) nie wywarło wpływu na poziom LDF w penumbrze; 4 – wielkość uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu była istotnie większa w grupie kontrolnej szczurów szczepu SHR (uszkodzenie $40,48 \pm 1,41\%$ ipsilateralnej półkuli mózgu) w porównaniu z uszkodzeniem w grupie kontrolnej szczurów

szczepu SD (uszkodzenie $34,4 \pm 1,4\%$ ipsilateralnej półkuli mózgu); u obu szczepów szczurów NPY(13-36) statystycznie istotnie zmniejszył obszar uszkodzenia mózgu w każdym z wariantów podania; 5 – w badaniach behawioralnych wykonanych 72 godziny po reperfuzji mózgu, w grupach kontrolnych szczurów SD i SHR zaobserwowano podobne upośledzenie chodu wyrażone przede wszystkim zmniejszeniem średniej prędkości, wydłużeniem czasu cyklu kroku i wyraźnym skróceniem długości kroku w porównaniu do wielkości tych parametrów sprzed niedokrwienia; w obu grupach z NPY(13-36) parametry chodu uległy poprawie, przy czym peptyd podany w czasie niedokrwienia był bardziej skuteczny; zmiany obserwowane po niedokrwieniu w teście otwartego pola były również podobne w grupach kontrolnych szczurów SD i SHR, odnotowano wyraźny spadek mobilności zwierząt manifestujący się skróceniem czasu spędzonego na przemieszczaniu się i całkowitej drogi przebytej w okresie 10 minut obserwacji, co przekładało się na zmniejszenie prędkości chodu; w obu grupach szczurów szczepów SD i SHR, którym podano NPY(13-36) nie zaobserwowano poprawy ruchliwości spontanicznej w tym teście; 6 – odpowiedź LDF na hiperkapnię, w korze mózgowej w obszarze półcienia nie zmieniła się istotnie u szczurów szczepu SD 24 godziny po reperfuzji w porównaniu do odpowiedzi w grupie z niedokrwieniem pozorowanym. U szczurów szczepu SHR odpowiedź LDF na hiperkapnię w grupie kontrolnej uległa istotnemu pogorszeniu, a podanie NPY(13-36) nie poprawiło tej odpowiedzi; ponadto, w grupach kontrolnych szczurów szczepów SD i SHR zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie odpowiedzi na podanie L-NAME w porównaniu z odpowiedzią u szczurów w grupach z niedokrwieniem pozorowanym; NPY(13-36) przywrócił tę odpowiedź jedynie u szczurów SHR i tylko wtedy, kiedy był poddany w fazie reperfuzji; 7 – w badaniach immunofluorescencyjnych z użyciem przeciwciała anti-RECA-1 wykazano, że gęstość najmniejszych naczyń krwionośnych kory mózgowej w warunkach podstawowych jest mniejsza u szczurów SHR niż u SD; 72 godziny po reperfuzji gęstość mikronaczyń w korze mózgowej w obszarze penumbry zmniejszyła się statystycznie istotnie zarówno u szczurów szczepu SD jak i SHR; NPY(13-36) przywracał ją, niezależnie od momentu podania; 8 – analiza stopnia przeciekania mikronaczyń wykazała, że szczury z nadciśnieniem tętniczym w warunkach podstawowych mają ok. 3 razy więcej naczyń przeciekających niż szczury normotensyjne; po niedokrwieniu odnotowano zwiększenie liczby naczyń przeciekających u obu szczepów szczurów, jednak podanie NPY(13-36) nie zmniejszyło liczebności miejsc przeciekania.

Podsumowując, NPY(13-36) wywiera korzystne działanie ochronne na niedokrwiony mózg na poziomie mikrokrążenia, zarówno u szczurów zdrowych jak i obciążonych

nadciśnieniem tętniczym. Działanie to obejmuje: i) zwiększenie mikroprzepływu w korze mózgowej w strefie penumbry w czasie niedokrwienia u szczurów SD, sugerujące rekrutację krążenia obocznego; ii) zmniejszenie obszaru poniedokrwiennej martwicy mózgu, poprawę parametrów chodu oraz zwiększenie gęstości najmniejszych naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej w obszarze penumbry u szczurów SD i SHR 72 godziny po reperfuzji mózgu (skuteczność przy podaniu zarówno w fazie niedokrwienia jak i reperfuzji); iii) poprawę reaktywności mikroprzepływu w obszarze penumbry na zablokowanie syntazy tlenu azotu u szczurów SHR (skuteczność przy podaniu w fazie reperfuzji).