

lek. Łukasz Adrian Poniatowski

Wpływ domózgowych podań Atsttrin na procesy neurodegeneracyjne i rozwój reakcji zapalnej w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) u myszy

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

Promotor: dr hab. n. med. Ilona Joniec-Maciejak

Promotor pomocniczy: dr n. med. Adriana Wawer

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Choroba Parkinsona stanowi jedną z najczęściej występujących w populacji przewlekłą chorobę neurodegeneracyjną dotykającą ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Szacuje się, że na świecie żyje około 10 milionów ludzi z rozpoznaną chorobą Parkinsona. Wystąpienie choroby związane jest w znacznym stopniu z pogorszeniem jakości życia, oraz pomimo zastosowanego leczenia zachowawczego i operacyjnego, prowadzi do stopniowej utraty samodzielności oraz inwalidztwa, głównie w populacji osób starszych. Klasyczna definicja choroby Parkinsona zakłada występowanie kardynalnych objawów motorycznych, takich jak: spowolnienie ruchowe, drżenie spoczynkowe, sztywność mięśniowa oraz kompleksowe zaburzenia odruchów posturalnych wyrażających się kompleksowo pod postacią zespołu hipertoniczno-hipokinetycznego. Zaburzenia pozaruchowe choroby obejmują m.in. zaburzenia autonomiczne, zaburzenia neuropsychiatryczne związane z pogorszeniem funkcji poznawczych, dysfunkcje czuciowe oraz zaburzenia snu, których nasilenie nie koreluje zazwyczaj z aktualnym stanem sprawności motorycznej chorego. Wystąpienie objawów neurologicznych stanowi efekt kompleksowego zachwiania równowagi między systemami neuroprzebieżnikowymi nie tylko w obrębie zwojów podstawy, lecz także w całym systemie neuronalnym zawiadującym funkcjami ruchowymi. Następne zaburzenia projekcji w innych układach neuroprzebieżnikowych stanowią przyczynę pojawienia się objawów pozaruchowych, wykraczających poza typowe objawy osiowe. Aktualnie opisano i scharakteryzowano kilka grup czynników etiopatologicznych ryzyka wystąpienia choroby Parkinsona o różnym znaczeniu. Do szeregu zidentyfikowanych czynników modyfikowalnych i niemodyfikowalnych, w wysokim stopniu predysponujących do wystąpienia schorzenia, opierając się na teorii wieloczynnikowej, należy zaliczyć m.in. zaawansowany wiek, płeć, czynniki środowiskowe, czynniki genetyczne, jak również styl życia oraz dietę. Istotą patogenezy choroby Parkinsona jest kaskada zdarzeń prowadzących w efekcie do degeneracji kontrolujących funkcje ruchowe neuronów dopaminergicznych z późniejszą depigmentacją istoty czarnej (SN), czemu towarzyszy konsolidacja dysfunkcyjnych neurofibrilarnych związków białkowych zawierających alfa (α)-synukleinę (ASN) oraz spadek poziomu stężenia dopaminy (DA) w obrębie struktur układu nigrostriatalnego. Do pozostałych czynników patogenetycznych można zaliczyć zaburzenia funkcji mitochondriów, stres oksydacyjny, ekscytotoksyczność kwasu glutaminowego (GLU),

zaburzenia funkcji proteasomów, jak również występującą reakcją zapalną. Aktualnie uważa się, że miejscowa i uogólniona odpowiedź układu immunologicznego pełni znaczącą rolę w patogenezie choroby Parkinsona, jak również innych schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym. Ponadto, wiadomo również, że reakcja neurozapalna w obrębie OUN stanowi proces, który z jednej strony może nasilać zjawisko neurodegeneracji, jak również stanowić protekcyjny mechanizm kompensacyjny uruchamiany w obszarze uszkodzonych neuronów. Analiza wciąż rosnącej liczby doniesień ukierunkowuje w tym przypadku uwagę na szczególną rolę reakcji neurozapalnej w patogenezie choroby Parkinsona. Aktualnie wielu niezależnych autorów skupia się w swoich pracach nad identyfikacją oraz precyzyjnym opisem mechanizmów zapalnych odpowiedzialnych za rozwój procesów neurodegeneracyjnych wskazując pośrednio na szczególne znaczenie tego zagadnienia. Złożony przebieg choroby Parkinsona, jak również dążenie do optymalizacji i uzyskania najlepszych efektów leczenia wymaga wielospecjalistycznej opieki oraz interdyscyplinarnego podejścia. Model kompleksowej, koordynowanej terapii oraz opieki obejmuje postępowanie farmakologiczne, rehabilitację, psychoterapię, leczenie operacyjne, jak również pozostałe terapie pozafarmakologiczne. Główne cele leczenia w chorobie Parkinsona obejmują spowolnienie postępu choroby, zmniejszenie nasilenia objawów ruchowych, zapobieganie lub opóźnienie pojawienia się powikłań oraz kontrolę objawów pozaruchowych. Najważniejszym celem leczenia choroby Parkinsona jest trwałe uzupełnienie niedoboru DA, jak również odbudowa prawidłowych szlaków korowo-podkorowych w mózgu, co jest obecnie przedmiotem prowadzonych badań w fazie eksperymentalnej. Aktualnie równoległym kierunkiem badań terapii choroby Parkinsona jest wzbogacenie tkanki nerwowej w określone związki i białka poprzez bezpośrednie podanie domózgowe za pomocą metod stereotaktycznych aktywnych form czynników wzrostu, neuromorfogenów, cytokin, związków neuroprotekcyjnych oraz rekombinowanych form pochodnych tych związków do struktur głębokich mózgu lub układu komorowego. Istotą obecnie wytyczonych nowoczesnych kierunków i wyzwań w terapii choroby Parkinsona jest udoskonalenie i optymalizacja leczenia farmakologicznego, jak również zastosowanie osiągnięć medycyny regeneracyjnej w zakresie możliwie trwałego uzupełnienia niedoboru DA poprzez odbudowę prawidłowych szlaków i połączeń korowo-podkorowych w mózgu powodując kliniczną poprawę u leczonych pacjentów. Niestety, mimo ogromnego postępu w zrozumieniu patomechanizmów leżących u podstaw choroby Parkinsona,

nadal nie jest dostępna terapia stanowiąca leczenie przyczynowe, która efektywnie zatrzymałaby lub spowolniła jej naturalny przebieg. W związku z tym aktualnie trwają badania i poszukiwania nowych skutecznych związków farmakologicznych, sposobów potencjalizacji działania poznanych wcześniej leków oraz innowacyjnych metod operacyjnych terapii choroby Parkinsona. Aktualna wiedza i dane eksperymentalne na temat poszczególnych koncepcji mechanizmów śmierci neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w obrębie SN stanowią efekt znacznego rozwoju warsztatu badawczego, wykorzystującego zwierzęce modele doświadczalne choroby Parkinsona. Punktem wyjścia do ich opracowania stanowiło w dużym zakresie wykrycie szeregu związków posiadających silne właściwości neurotoksyczne w odniesieniu do neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych w obrębie układu nigrostriatalnego. Podstawowe modele eksperymentalne choroby Parkinsona, które są obecnie najczęściej wykorzystywane w badaniach doświadczalnych bazują na związkach, które wykazują wysoki stopień neurotoksyczności i jednocześnie trwale uszkadzają neurony dopaminergiczne. Jedną z takich substancji jest 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna (MPTP), stanowiąca produkt uboczny syntezy pochodnych heroiny, której efekt farmakologiczny związany jest z powtarzalnym i specyficznym zwyrodnieniem neuronów dopaminergicznych oraz ich zakończeń w obrębie prążkowa (ST), jak również wystąpieniem typowych objawów parkinsonowskich u naczelnych oraz u wybranych gatunków gryzoni. Modele zakładające użycie chlorowodoru MPTP (MPTP-HCL) stanowią swoisty złoty standard dla eksperymentów i badań nad patofizjologią śmierci neuronów dopaminergicznych w przebiegu choroby Parkinsona, najpełniej odwzorowując zarówno symptomy choroby, jak również powstający ubytek funkcji szlaku nigrostriatalnego.

W ostatnim czasie endogenne białko pełniące funkcję czynnika wzrostu, jakim jest progranulina (PGRN) zwróciło szczególną uwagę badaczy ze względu na silne i specyficzne działanie neurotroficzne, przeciwzapalne oraz immunomodulujące. Analizując cechy klasyfikacji ewolucyjnej i strukturalnej, PGRN wydaje się jak dotąd unikatową cząsteczką, której nie można jednoznacznie zaklasyfikować do żadnej znanej rodziny czynników wzrostu. Może ona wykazywać jednocześnie działanie czynnika wzrostu, cząsteczki przeciwzapalnej, adipokiny oraz stanowić źródło poszczególnych domen granulin (GRN) o potencjalnie zapalnym działaniu. Przeprowadzone badania przedkliniczne z wykorzystaniem myszy transgenicznym oraz analizy pośmiertne na ludziach przy użyciu metod proteomicznych, transkryptomicznych oraz

immunofluorescencyjnych pozwoliły zapewnić wgląd we wzorzec ekspresji genu PGRN oraz stopień indukcji jego produktów białkowych w obrębie tkanki nerwowej. Ocena poszczególnych populacji komórkowych OUN wykazuje, że ekspresja PGRN jest konstytutywnie obecna na powierzchni neuronów oraz nieaktywnego mikrogleju, podczas gdy nie obserwuje się jej na astrocytach oraz ependymocytach. Przeprowadzone do tej pory badania na modelach eksperymentalnych oraz w warunkach klinicznych, w ramach innych układów narządowych mocno ugruntowały rolę PGRN jako czynnika biorącego udział w reakcji zapalnej. PGRN stanowi istotny czynnik biorący udział w reakcji neurozapalnej pełniąc rolę immunomodulującą i wykazując szerokospektralne działanie przeciwzapalne oraz hamując aktywność mikrogleju. W tym przypadku utrata funkcji PGRN w obrębie tkanki nerwowej prowadzi do ogólnych zaburzeń funkcji lizosomów, nadmiernej produkcji składników dopełniacza, jak również deregulacji oraz nadmiernej odpowiedzi neurozapalnej skutkując ostatecznie wystąpieniem złożonych zmian neuropatologicznych. Implikowaną rolę PGRN należy traktować jako jedną ze składowych elementów skoordynowanego i wieloczynnikowego mechanizmu neurofizjologicznego. Analiza dostępnych opracowań i badań wskazuje, iż identyfikacja mutacji w genie PGRN jest potencjalnie związana z predyspozycją do wystąpienia chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, w tym choroby Parkinsona. Atsttrin stanowi zmodyfikowaną cząsteczkę białka, którego budowa jest oparta na strukturze łańcucha polipeptydowego PGRN. Przeprowadzone do tej pory analizy i badania pozwoliły zaobserwować szereg strukturalnych i funkcjonalnych właściwości Atsttrin, które są związane z mechanizmami molekularnymi interakcji tego związku z receptorami dedykowanymi czynnikiowi martwicy nowotworów alfa (TNF- α), takim jak receptor typu 1 (TNFR1) oraz typu 2 (TNFR2). Zaobserwowano, że w skład łańcucha polipeptydowego PGRN wchodzi trzy domeny, które mogą wiązać się do receptorów TNFR1 oraz TNFR2 w sposób niezależny, co wydaje się potencjalnie możliwe poprzez wewnętrzne związanie się ich sekwencji łącznikowych, co wynika z drugorzędowej oraz trzeciorzędowej struktury białka. W przeciwieństwie do PGRN, nie stwierdzono aby Atsttrin ulegało rozpadowi i uwalniało domeny GRN o działaniu zapalnym w przypadku ekspozycji na enzymy proteolityczne rozszczepiające PGRN. Ta sama strukturalna właściwość pozwala zachować Atsttrin powinowactwo do receptorów TNFR1 oraz TNFR2 oraz potencjalnie uniknąć efektów biologicznych charakterystycznych dla działania cytokin i czynników wzrostu. Przeprowadzone badania doświadczalne wskazują, że Atsttrin

może stanowić obecnie jeden z bardziej obiecujących i innowacyjnych środków terapeutycznych w leczeniu stanów związanych z zapaleniem stawów, takich jak choroba zwyrodnieniowa stawów (OA) i reumatoidalne zapalenie stawów (RA) poprzez bezpośrednie wiązanie się z TNFR1 oraz TNFR2, jak również równoległe antagonistyczne działanie względem TNF- α , wykazując w tym mechanizmie swoje właściwości przeciwzapalne.

Założeniem i celem pracy doktorskiej była ocena wpływu bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania Atsttrin za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6. Przeprowadzone procedury eksperymentalne i badawcze miały na celu wyjaśnienie czy zastosowanie Atsttrin może być potencjalnie skuteczne w terapii choroby Parkinsona wykazując zakładane działanie neuroprotektcyjne, jak również potencjalnie implikować opracowanie a następnie zastosowanie w przyszłości nowych celowanych terapii opartych na tym związku w praktyce klinicznej. Dodatkowym założeniem pracy było pogłębienie wiedzy dotyczącej farmakologicznych mechanizmów działania Atsttrin, jak również optymalizacja i walidacja alternatywnej metody podania związku obejmująca bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję tego związku. W pierwszym, wstępnym etapie przeprowadzono analizę ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin zastosowanych w trakcie bezpośredniego bilateralnego podania domózgowego do ST za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. Etap ten obejmował wyznaczenie zależności dawka-odpowiedź i dawka-efekt, poprzez wykreślenie krzywej wzorcowej, koniecznej do identyfikacji potencjalnej, skutecznej terapeutycznie i bezpiecznej dawki Atsttrin w obrębie wybranych struktur mózgu takich jak hipokamp (CA), kora (CX), mózdzek (CM) oraz ST. W drugim, właściwym etapie oceniano kolejno wpływ bezpośredniego bilateralnego domózgowego podania empirycznie wyznaczonej dawki Atsttrin do ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. Etap ten obejmował ocenę potencjalnie neuroprotektyjnego wpływu Atsttrin na przebieg procesów neurodegeneracyjnych i rozwój reakcji zapalnej w obrębie wybranych struktur mózgu takich jak CA, CX, CM oraz ST. Predefiniowana wartość zakresu obejmującego pięć wzrastających dawek Atsttrin wynoszących odpowiednio 0.1 μg (0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 0.5 μg

(0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μg (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oraz 5 μg (1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) została ekstrapolowana i wyznaczona na podstawie danych literaturowych z wcześniej przeprowadzonych badań dotyczących układu mięśniowo-szkieletowego w analogicznych mysich modelach chorób. Panel analizowanych parametrów obejmował kolejno ekspresję cytokin i mediatorów zapalnych (IL-1 α , TNF- α , IL-6, IFN- γ oraz COX-2), ekspresję cytokin i mediatorów przeciwzapalnych (IL-10), ekspresję parametrów stresu oksydacyjnego i nitracyjnego (iNOS oraz nNOS), ekspresję czynników wzrostu i neurotroficznym (TGF- β oraz BDNF), jak również ekspresję enzymów związanych z metabolizmem neurotransmiterów (TH oraz TG2) mierzoną za pomocą metody Real-time PCR. Ponadto dokonano analizy ośrodkowego profilu neurochemicznego poprzez ocenę stężeń monoamin (DA, DOPAC, 3-MT, HVA, NA, MHPG, 5-HT oraz 5-HIAA), jak również stężeń aminokwasów (GLU, GABA, ALA, ASP, TAU, HIS oraz SER) mierzonych za pomocą metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zgodnie z danymi uzyskanymi z analizy ogólnej kinetyki wpływu wzrastających dawek Atsttrin na zależność dawka-odpowiedź i dawka-efekt oraz wynikami odczytanymi z wykreślonej krzywej wzorcowej celem przeprowadzenia i uzupełnienia dalszej, właściwej części badania wybrano dawkę 0.5 μg (0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), która zapewniała optymalny efekt farmakologiczny i charakteryzowała się jednocześnie dostatecznie wysokim poziomem bezpieczeństwa w mikrośrodowisku tkanki mózgu. Obserwowane zmiany wartości analizowanych parametrów po zastosowaniu tej dawki Atsttrin w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym dootrzewnową intoksykacją MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 znajdują w tym przypadku swoje subiektywnie zbliżone odbicie w obserwowanych efektach przeciwzapalnych wykazanych w czasie wcześniejszych badań tego związku w innych modelach jednostek chorobowych oraz układach narządowych. W drugiej, właściwej części, kolejno zwiększono panel grup badanych i kontrolnych uwzględniając rozszerzony zakres przeprowadzonych procedur oraz interwencji o zwierzęta poddane iniekcji do SN. Na tym etapie wykonano również stereotaktyczne podania Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) do struktur ST lub SN u myszy niepoddanych innym interwencjom. Panel parametrów analizowany w drugiej części badania obejmował ekspresję wybranych mediatorów, czynników oraz enzymów na poziomie transkrypcyjnym oraz analizę zmian ośrodkowego profilu neurochemicznego w podobnym zakresie jak w trakcie pierwszej części badania. Stwierdzono, iż bezpośrednie bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 μg

(0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) za pomocą metod stereotaktycznych do ST oraz SN jest związane z zahamowaniem procesów neurodegeneracyjnych oraz reakcji zapalnej w obrębie ST, CA, CX oraz CM w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL. Dodatkowo zaobserwowano, iż bezpośrednie bilateralne domózgowe podanie Atsttrin w dawce 0.5 μg (0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) za pomocą metod stereotaktycznych do ST oraz SN jest związane z wystąpieniem zmian poziomów ekspresji wybranych mediatorów, czynników i enzymów na poziomie transkrypcyjnym, jak również ze zmianą ośrodkowego profilu neurochemicznego aminokwasów i monoamin u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych żadnej dodatkowej procedurze eksperymentalnej.

Jak wykazano, uzyskane wyniki pozwoliły na zweryfikowanie czy zastosowanie Atsttrin może stanowić w przyszłości nowy, potencjalnie obiecujący element farmakologiczny strategii terapeutycznej leczenia choroby Parkinsona. Wykonanie bezpośredniego domózgowego podania Atsttrin wywiera efekt neuroprotekcyny na uszkodzone neurony wchodzące w skład szlaku nigrostriatalnego. Jednym z podstawowych mechanizmów neuroprotekcynnego działania Atsttrin jest hamujący i modulujący wpływ na kinetykę ekspresji wybranych mediatorów reakcji zapalnej. Przedstawione wyniki skłaniają do prowadzenia dalszych badań służących pogłębieniu wiedzy na temat Atsttrin dotyczących farmakologicznych mechanizmów działania tego związku, optymalizacji metod jego podawania, jak również co za tym idzie jego potencjalnego zastosowania w warunkach klinicznych.