

Mgr inż. Ewelina Bratek

**Neuroprotekcyjne działanie LY379268 – agonisty receptorów
metabotropowych grupy II (mGluR2/3) – w doświadczalnym modelu
asfiksji okołoporodowej**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie:

biologia medyczna

Promotor: dr. hab. Elżbieta Salińska, prof. IMDiK



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

Warszawa, 2018

Streszczenie

Encefalopatia niedotlenieniowo - niedokrwienna (ENN) charakteryzuje się trwałymi uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego, które mogą prowadzić do śmierci noworodka lub zaburzeń rozwojowych. 20% -30% niemowląt z ENN umiera w okresie noworodkowym, a 33% -50% dzieci, które przeżyły, wykazuje trwałe nieprawidłowości w rozwoju układu nerwowego (takie jak porażenie mózgowe) i upośledzenie umysłowe. Ostatnio wykazano, że aktywacja receptorów metabotropowych dla glutaminianu grupy II (mGluR2/3) przed lub po udarze niedokrwiennym prowadzi do neuroprotekcji, ale dokładny mechanizm tego efektu nie jest jasny. Niedotlenienie-niedokrwienie mózgu, inaczej hipoksja-ischemia (H-I) powoduje zaburzenia metabolizmu energetycznego, zmniejszenie produkcji ATP, zaburzenia potencjału błonowego, a w konsekwencji nadmierne wydzielanie glutaminianu. Zwiększone uwalnianie glutaminianu powoduje nadmierną aktywację receptorów NMDA, sprzężonych z kanałami jonowymi przepuszczalnym dla Ca^{2+} . Nadmierny napływ jonów wapnia do neuronów uruchamia kaskadę reakcji prowadzących w efekcie do śmierci komórki.

Stres oksydacyjny wynikający z nadprodukcji reaktywnych form tlenu (RFT) jest niezwykle ważnym elementem wywołanego przez niedokrwienie uszkodzenia komórek nerwowych. W normalnych warunkach, mechanizmy obronne komórek utrzymują niski RFT i zapobiegają stresowi oksydacyjnemu. Jednak podczas hipoksji-ischemii rodniki tlenowe są produkowane w nadmiarze, nie są odpowiednio neutralizowane i usuwane, przez co osiągają stężenia toksyczne. Skutkuje to zaburzeniami funkcji komórkowych oraz uszkodzeniem błon lipidowych, białek i DNA. Komórkowy system ochrony przed RFT stanowią przede wszystkim enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) i katalaza oraz koenzym glutationu. SOD, występująca u ssaków w trzech formach: cytoplazmatycznej cynkowo-miedziowej (SOD1), mitochondrialnej manganowej (SOD2) oraz zewnątrzkomórkowej cynkowo-miedziowej (SOD3), katalizuje reakcję przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) do nadtlenu wodoru (H_2O_2) i tlenu cząsteczkowego. Z kolei enzymami odpowiedzialnymi za utrzymanie niskich stężeń nadal toksycznego H_2O_2 w komórkach są GPx i katalaza. Glutation bierze udział w detoksykacji H_2O_2 , nadtlenuków organicznych i innych reaktywnych form tlenu oraz w odtwarzaniu uszkodzonych w procesach peroksydacyjnych składników komórki.

Coraz częściej skupiana jest uwaga na receptorach mGluR2/3 i ich roli w uszkodzeniu mózgu po H-I. Receptory mGluR2/3 są negatywnie sprzężone z cyklazą adenylową i działają jako presynaptyczne autoreceptory, które regulują uwalnianie glutaminianu. Dlatego wydaje się, że agoniści tych receptorów są obiecującymi celami dla indukcji neuroprotekcji. Ze względu na rolę mGluR2/3 w monitorowaniu nadmiernego uwalniania glutaminianu, ich aktywacja może hamować ekscytotoksyczność i mieć istotny wpływ na rozwój uszkodzenia H-I. Neuroprotekcyjne działanie selektywnych agonistów mGluR2/3 w uszkodzeniu mózgu wywołanym niedokrwieniem wykazano w badaniach na modelach zwierzęcych. Neuroprotekcyjne działanie selektywnego agonisty mGluR2/3, (-)-2-oksa-4-aminobicyklo [3.1.0] heksano-4,6-dikarboksyłowego (LY379268) zaobserwowano po iniekcji w krótkim czasie po H-I u osesków szczurzych i w globalnym niedokrwieniu u myszokoczeków

(gerbille). Niedawno wykazano również, że mGluR2/3 uczestniczy w indukcji tolerancji niedokrwiennej. Zmniejszenie uwalniania glutaminianu wydaje się być oczywistym elementem neuroprotekcji, w której pośredniczy aktywacja mGluR2/3; jednak dokładny mechanizm wciąż nie jest w pełni zrozumiały i wydaje się być złożony.

Dlatego zakładając, że aktywacja mGluR2/3 po H-I może indukować tolerancję na niedokrwienie i mieć działanie neuroprotektoryjne, postanowiliśmy dokładniej zbadać mechanizm(y) molekularny tego efektu.

Celem badań było określenie potencjału neuroprotektoryjnego LY379268 w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów. W celu zbadania neuroprotektoryjnego działania agonisty mGluR2/3 LY379268 postanowiono:

- ocenić wpływ agonisty mGluR2/3 na uszkodzenie mózgu osesków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii,
- zbadać okno terapeutyczne pozwalające na skuteczne zastosowanie agonisty (badane okno - 1 do 6 godzin po H-I),
- zbadać wpływ LY379268 na parametry stresu oksydacyjnego,
- ocenić wpływ agonisty mGluR2/3 na procesy apoptotyczne i syntezę czynników troficznych

Neuroprotektoryjne działanie LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I określono na podstawie oceny jego wpływu na uszkodzenie mózgu osesków szczurzych poddanych modelowej ENN. Aby ocenić wpływ agonisty na stres oksydacyjny spowodowany przez H-I, mierzono poziom RFT, zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, katalazy) i zmiany poziomu GSH. Ponadto, by ustalić efekt LY379268 na procesy apoptotyczne, zbadano ekspresję białek Bcl-2, Bax, AIF, Htr2/Omi. Dodatkowo mierzono aktywność proapoptotycznych enzymów kaspazy-3 i kaspazy-9. Zbadano również ekspresję czynników troficznych GDNF, BDNF, TGF-beta.

Badanie wykazało, że LY379268 podany 1 godz. lub 6 godz. po H-I znacznie zmniejszył uszkodzenie mózgu spowodowane przez H-I. Neuroprotektoryjne działanie agonisty manifestowało się zmniejszeniem ubytku masy półkuli ipsilateralnej oraz zmniejszeniem obszaru martwicy mózgu. W badaniu mikroskopowym stwierdzono, że agonista zapobiegał zmianom morfologicznym w hipokampie oraz korze ipsilateralnej półkuli mózgu. Iniekcja LY379268 w obu grupach czasowych zapobiegała apoptotycznym zmianom w neuronach w sektorze CA1 hipokampa, co wykazano za pomocą testu TUNEL. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że podanie LY379268 hamuje śmierć apoptotyczną i nekrotyczną neuronów. Zastosowanie LY379268 zmniejszyło poziom RFT w półkulach ipsilateralnych zwierząt poddanych H-I. H-I spowodowała wzrost aktywności SOD, co wskazuje na obronną reakcję organizmu. Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I spowodowała zmniejszenie aktywności SOD, co w odniesieniu do obserwowanych efektów neuroprotektoryjnych może wskazywać na niższą produkcję (neutralizację) RFT. Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po HI przywróciła również poziom glutationu zredukowanego (GSH) w półkulach

ipsilateralnych do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych. Glutation jest substratem w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową. H-I powodowała wzrost aktywności tego enzymu, natomiast iniekcja LY 379268 niezależnie od czasu podania powodowała spadek aktywności GPx. H-I powodowało również wzrost aktywności katalazy, a LY379268 podany w obu punktach czasowych zmniejszał aktywność tego enzymu.

H-I powodowała zmiany w ekspresji białek szlaku apoptotycznego oraz czynników neurotroficznych w obu półkulach mózgu. Ekspresja anty-apoptotycznego białka Bcl-2 zmniejszała się po H-I, a iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I przywracała poziom tego białka do zbliżonego obserwowanego w kontroli. LY379268 podany w obu czasach zmniejszał wywołany H-I wzrost ekspresji Bax, Htr2/Omi i AIF.

H-I spowodowało także wzrost aktywności kaspazy-3 i kaspazy-9 w półkulach ipsilateralnych. Zastosowanie agonisty mGluR2/3 1 godz. lub 6 godz. po H-I znacząco zmniejszyło aktywność kaspaz w porównaniu do H-I.

H-I w znacznym stopniu obniża stężenia BDNF oraz podwyższa stężenie GDNF i TGF-beta w obu półkulach mózgu. LY379268 podany 1 godz. lub 6 godz. po H-I spowodował zmniejszenie ekspresji czynników troficznych GDNF i TGF-beta w porównaniu do H-I oraz zwiększył ekspresję BDNF w porównaniu do samej H-I.

Te dane pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- LY 379268 podany 1 godz. lub 6 godz. po H-I u siedmiodniowych szczurów ma podobny potencjał neuroprotekcyny, co wskazuje na możliwość zastosowania go jako potencjalnego leku w dość szerokim oknie terapeutycznym,
- wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych po H-I wskazuje, że w neuronach uruchomione zostały obronne mechanizmy.
- spadek aktywności tych enzymów po podaniu LY379268 sugeruje, że obserwowany równocześnie spadek poziomu RFT jest prawdopodobnie wynikiem zahamowaniem ich syntezy w neuronach,
- spadek aktywności czynników pro-apoptotycznych obserwowany po podaniu LY379268 najprawdopodobniej związany jest z niedopuszczeniem do ekscytotoksycznego uszkodzenia mitochondriów i zapoczątkowania apoptozy,
- zmiany w ekspresji białek neurotroficznych po podaniu LY379268, a zwłaszcza białka TGF-beta wskazują, że hipoteza neuroprotekcynnego działania tego agonisty poprzez stymulowanie ekspresji białek neurotroficznych wymaga weryfikacji.

Głównym wnioskiem wynikającym z wyników badań zamieszczonych w tej pracy, jest potwierdzenie znaczącej roli w obserwowanej po H-I neuroprotekcji, bezpośredniego efektu LY379268 na metabotropowe receptory glutaminianu i hamowanie neurodegeneracji poprzez zmniejszenie ekscytotoksyczności przez zablokowanie uwalniania glutaminianu.

Abstract

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) results in permanent damage of the central nervous system that may lead to neonatal death or developmental disorders. 20%–30% of infants with HIE die in the neonatal period, and 33%–50% of survivors demonstrate permanent neurodevelopmental abnormalities (such as cerebral palsy) and mental retardation. It was shown recently that the group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3) activation before or after ischemic insult results in neuroprotection but the exact mechanism of this effect is not clear. Hypoxia-ischemia (H-I) results in abnormal energy metabolism, decrease of ATP synthesis, disturbances in cell membrane potential, and consequently excessive release of glutamate. Increased extracellular concentration of glutamate causes excessive activation of NMDA receptors, which are glutamatergic receptors coupled with ion channel permeable to Ca^{2+} .

Oxidative stress, resulted from excessive production of reactive oxygen species (ROS) is a very important component of ischemia-induced pathogenesis of neuronal cells. Under normal conditions, the defensive mechanisms of the cell maintain low concentration of ROS preventing development of oxidative stress. However, during hypoxia-ischemia, oxygen radicals are produced in excess, they are not sufficiently 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 antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase and coenzyme glutathione. SOD, which is present in mammal cells in three different 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 still toxic. Glutathione is involved in the detoxification of hydrogen peroxide, organic peroxides and other reactive oxygen species and in the regeneration of damaged cell components. It also works as a coenzyme with GPx.

Group II metabotropic glutamate receptors and their role in H-I brain injury have gained increasing attention. Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2) and 3 (mGluR3), negatively coupled to cyclic AMP formation, act as presynaptic autoreceptors that regulate glutamate release and therefore appear to be promising targets for the induction of neuroprotection. Because of the role of mGluR2/3 in the monitoring of any excessive glutamate that escapes from the synaptic active zone, their activation and suppression of glutamate release may have an important impact on the development of H-I injury.

The neuroprotective effects of selective agonists of mGluR2/3 against ischemic brain injury have been shown in several animal studies. The neuroprotective effects of a mGluR2/3 agonist (-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic acid (LY379268), applied in a short time after the insult, were reported in an experimental model of birth asphyxia in rats and the global ischemia in gerbils. Recently mGluR2/3 has been also shown to be involved in the induction of ischemic tolerance. The reduction in glutamate release appears to be an obvious element of the neuroprotection mediated by mGluR2/3 activation; however, the exact

mechanism of this neuroprotection is still not fully understood and seems to be complex. Therefore, assuming that the activation of group II mGluRs before H-I may prevent ischemic damage and have a neuroprotective effect, we decided to investigate more closely the molecular mechanism(s) of this effect.

The aim of the research was to:

- determine neuroprotective effect of LY379268 in neonatal rat H-I model,
- determine the therapeutic window for LY379268 effect,
- examine the effect of LY379268 on parameters of oxidative stress, which can be one of the potential factors of neuroprotective action of mGluR2/3 in HI model,
- determine the effect of LY379268 on apoptotic processes and expression of neurotrophic factors

The neuroprotective effect of LY379268 injected 1 or 6 hour after H-I was determined based on their effects on brain damage of rats. To evaluate the effect of agonist on oxidative stress caused by H-I, ROS production, changes in the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, catalase) and changes of GSH level were measured. The expression of Bcl-2, Bax, AIF, HTr2/Omi proteins in homogenates from rat brains after LY379268 injected was investigated. Additionally, the activity of pro-apoptotic enzymes caspase-3 and caspase-9 was measured. The expression of trophic factors GDNF, BDNF, TGF-beta was also measured.

The study showed, that LY379268 injected 1 h or 6 h after H-I significantly reduced brain damage caused by H-I. The neuroprotective effect of the tested methods was manifested by reduced weight loss of the ipsilateral hemisphere and a reduction of necrosis. Agonist prevented morphological changes in the hippocampus, which were visualized in microscopic examination using cresyl violet staining. Injection of LY379268 at both times after H-I partially prevented disorganization of neurons in the CA1 region of the hippocampus and significantly reduced cell loss in cerebral cortex of ipsilateral hemispheres. In addition, LY379268 applied at each of examined times inhibited apoptotic and necrotic cell death in CA1 area of hippocampus, which was visualized by TUNEL staining.

The results show that the use of LY379268 decreased ROS level in ipsilateral hemispheres compared to H-I animals. H-I resulted in the increase of SOD activity, indicating that a defensive reaction was initiated. Application of LY379268 1 h or 6 h after H-I resulted in decreased SOD activity, which regarding observed neuroprotective effects, may suggest lower production of ROS. Injection of LY379268 1 h or 6 h after H-I restored decreased concentrations of GSH in the ipsilateral hemispheres after H-I to the baseline levels observed in control animals. Glutathione is a substrate in a reaction catalyzed by glutathione peroxidase. H-I resulted in significant increase in the activity of GPx, whereas application of LY379268 1 h or 6h after H-I decreased the activity of this enzyme. H-I resulted in an increase in catalase activity in the ipsilateral hemispheres. LY379268 injected in both times reduced activity of catalase.

Expression of Bcl-2, Bax, AIF, Htr2/Omi was examined using western blot method. Bcl-2 protein expression was decreased after H-I and the injection of LY 379268 1 h or 6 h after H-I insult increased Bcl-expression to the level observed before insult. The same changes were observed in contralateral hemispheres. Agonist of mGluR2/3 applied 1 h or 6 h after H-I reduced increased by H-I expression of Bax and Htr2/Omi or AIF in both hemispheres.

The activity of pro-apoptotic enzymes caspase-3 and caspase-9 was also measured. H-I resulted in an increase in caspase-3 and caspase-9 activity in the ipsilateral hemispheres. Application of mGluR2/3 agonists decreased expression of caspase-3 and caspase-9 in both hemispheres compared to H-I.

H-I reduced BDNF expression and increased expression of GDNF and TGF-beta in both hemispheres. The study showed, that LY379268 applied 1 h or 6 h after H-I significantly decreased the expression of trophic factors GDNF and TGF-beta compared to H-I. Use of LY379268 also increased BDNF expression in both hemispheres compared to H-I.

Obtained data allowed for the following conclusions:

- LY379268 applied at 1 h or 6 h after H-I results in a neuroprotective effect which indicates on its potential as a medicine with quite wide therapeutic window,
- the increase in antioxidant enzymes activity indicates that H-I triggered defence mechanisms in the cells.
- the decrease of the activity of these enzymes after LY379268 application suggests that observed decrease in ROS concentration is probably the effect of inhibition of ROS synthesis in neurons,
- the decrease in pro-apoptotic factors activity observed after LY379268 application is probably connected with the prevention of mitochondria damage and initiation of apoptosis,
- the changes in expression of neurotrophic proteins after LY379268 application, and especially changes in expression of TGF-beta, indicate that the hypothesis concerning the leading role of TGF-beta in LY379268 neuroprotective effects needs verification.

To sum up, the main conclusion arising from the results presented in this manuscript is the confirmation that in observed after H-I neuroprotection evoked by LY379268 application, the leading role plays a direct effect of LY379268 on metabotropic glutamate receptors group II and inhibition of glutamate release that results in a decrease of both excitotoxicity and neurodegeneration.