

Anna Czarnecka

Zakład Neuropsychofarmakologii

Instytut Farmakologii PAN

Tytuł pracy „Rola tlenu azotu w modulowaniu działania lewodopy w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona”

Promotor **Dr hab. Elżbieta Lorenc-Koci**

Recenzenci **Prof. dr hab. Jan Albrecht**

Prof. dr hab. n. med. Marek Kowalczyk

Streszczenie

Choroba Parkinsona (PD) jest jednym z najczęściej występujących schorzeń neurodegeneracyjnych u osób w podeszłym wieku, którego charakterystyczną neuropatologiczną cechą jest postępująca utrata czarnoprążkowiowych neuronów dopaminowych. Konsekwencją procesu neurodegeneracyjnego jest drastyczny spadek stężenia dopaminy (DA) zarówno w jądrze ogoniastym i łupinie jak i w istocie czarnej (SN). Poza tymi dobrze udokumentowanymi zmianami w układzie czarnoprążkowym w badaniach post mortem mózgów pacjentów parkinsonowskich wykazano, że w jądrze ogoniastym i łupinie dochodzi do 50% spadku ilości neuronów zawierających neuronalną syntazę tlenu azotu (nNOS) oraz do obniżenia ekspresji mRNA dla tego enzymu. Ponadto w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono obniżenie poziomu azotanów V wskazujące na zmniejszoną produkcję tlenu azotu (NO) w centralnym systemie nerwowym u parkinsoników. Coraz liczniejsze badania przeprowadzone w modelach zwierzęcych wskazują, że w prążkowie (STR) NO jest kluczowym modulatorem aktywności neuronalnej oraz czynnikiem krytycznym w regulacji funkcji motorycznych i plastyczności synaptycznej. W STR ten unikalny neuroprzekaźnik jest syntetyzowany w niewielkiej populacji interneuronów GABA, do których dochodzi gęsta sieć połączeń dopaminergicznych z SN oraz glutaminianergicznych z kory mózgowej. W szeregu badań elektrofizjologicznych i biochemicznych wykazano, że obustronna interakcja dopaminowo-glutaminianergiczna odgrywa decydującą rolę w stymulowaniu aktywności nNOS w tej strukturze. Głównym fizjologicznym celem dla NO syntetyzowanego w interneuronach nNOS w STR jest

rozpuszczalna cyklaza guanylanowa (sGC) znajdująca się głównie w średnich neuronach kolczystych tworzących jedyne projekcje wychodzące z tej struktury. Neurony te charakteryzują się wysokim poziomem tego enzymu jak i wysokim stężeniem cGMP. Zawierają one także zależną od cGMP kinazę białkową oraz fosfodiesterazy degradujące tylko cAMP, tylko cGMP lub oba te cykliczne nukleotydy. Najnowsze badania wskazują, że zaburzenia w przekazywaniu nitroergicznym w STR są następstwem degeneracji czarnoprążkowiowych neuronów dopaminowych. Dlatego też słusznym wydaje się teoretyczne założenie, że w terapii PD, oprócz uzupełniania niedoboru DA, należy również przywrócić równowagę funkcjonalną szlaku sygnałowego NO-sGC-cGMP.

Celem niniejszej pracy było zbadanie w szczurzym modelu PD roli NO w modulowaniu efektów behawioralnych i biochemicznych L-DOPA, najbardziej efektywnego leku stosowanego powszechnie w terapii tego schorzenia.

Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych samcach szczurów rasy Wistar Han z jednostronnie uszkodzonym czarnoprążkowym układem dopaminergicznym wywołanym podaniem 6-OHDA (8 µg/4 µl) do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (MFB). Dwa tygodnie po podaniu tej neurotoksyny weryfikowano stopień uszkodzenia tego układu w teście apomorfinowym. Do dalszych badań były brane zwierzęta z 90-95% spadkiem ilości neuronów dopaminergicznym w SN, które po podaniu apomorfiny (0,25 mg/kg) wykazywały więcej niż 100 pełnych obrotów kontralateralnych w ciągu 1 godziny. W pierwszej serii doświadczeń do modulowania działania L-DOPA użyto donora NO molsidominy, natomiast w drugiej serii w tym samym celu zastosowano inhibitory nNOS: selektywny 7-NI i nieselektywny L-NAME. Chroniczne, trwające 15 dni podania molsidominy i L-DOPA, oddzielne lub łączne, rozpoczynano w 14-tym dniu po wykonaniu jednostronnego uszkodzenia. Inhibitory nNOS podawano dwukrotnie w 27-ym i 28-ym dniu po podaniu 6-OHDA, same lub w kombinacji z chronicznie podawaną L-DOPA.

W pierwszej serii doświadczeń badano wpływ ostrych i chronicznych podań molsidominy (2 i 4 mg/kg) i L-DOPA (12,5 i 25 mg/kg) na zachowanie asymetryczne szczurów oraz na metabolizm DA i serotoniny (5-HT) w STR i SN. W obu badanych strukturach sprawdzano także wpływ chronicznych podań tych leków na ekspresję białek zaangażowanych w transmisję nitroergiczną: nNOS, sGC oraz fosfodiesterazy PDE-1B degradującej głównie cGMP. Dodatkowo w SN przeprowadzono szczegółową analizę stereologiczną ilości neuronów TH-immunoreaktywnych (TH-ir) i nNOS-ir oraz wszystkich neuronów tej struktury, które barwiono fioletem krezyłu (CV). Analizę neuronów nNOS-ir wykonano również w jądrze niskowzgórzowym (STN) po chronicznych podaniach L-DOPA.

Zarówno w SN jak i w STN przeprowadzono także stereologiczną analizę objętości. Ponadto w SN, STN i STR porównano rozmieszczenie neuronów nNOS-ir z rozmieszczeniem neuronów wykazujących aktywność NADPH-diaforazy.

W drugiej serii doświadczeń badano wpływ jednokrotnych podań 7-NI (50 mg/kg) lub L-NAME (50 mg/kg) oraz chronicznych podań L-DOPA (25 mg/kg) na zachowanie asymetryczne oraz dwukrotnych podań inhibitorów nNOS i chronicznych podań L-DOPA na metabolizm DA i 5-HT w STR i SN. W dodatkowych grupach szczurów badano wpływ jednokrotnych podań samych inhibitorów nNOS na aktywność lokomotoryczną oraz dwukrotnych podań tych związków na poziom katalepsji i metabolizm DA i 5-HT w STR i SN.

W pierwszej serii doświadczeń wykazano, że chroniczne podania molsidominy (2 mg/kg) łącznie z L-DOPA (25 mg/kg) zmniejszały ilość rotacji kontralateralnych w ciągu pierwszej godziny w porównaniu do ilości rotacji po podaniu samej L-DOPA. Inne kombinacje dawek badanych leków były mniej efektywne. Tkankowe stężenie DA w STR i SN po stronie ipsilateralnej oznaczane godzinę po podaniu ostatniej, chronicznej dawki molsidominy (2 mg/kg) w kombinacji z wysoką dawką L-DOPA (25 mg/kg) utrzymywało się na podobnie wysokim poziomie jak po chronicznych podaniach samej L-DOPA. Gdy oznaczenia poziomów DA wykonano 2 godziny po ostatnich dawkach tych leków, stężenia DA w STR i SN po stronie ipsilateralnej u zwierząt otrzymujących łącznie oba leki były znacząco wyższe niż u zwierząt otrzymujących samą L-DOPA. Co więcej, sama L-DOPA podnosiła w tym czasie poziom DA tylko w ipsilateralnej SN. Podobnie L-DOPA w dawce 12,5 mg/kg podnosiła stężenie DA oznaczane godzinę po ostatnim chronicznym podaniu tylko w ipsilateralnej SN, podczas gdy podawana łącznie z molsidominą (2 mg/kg) zwiększała poziom DA równocześnie w ipsilateralnym STR. Te ostatnie wyniki sugerują, że niskie dawki donora NO mogą wywierać korzystny modulujący wpływ na poziom DA w STR i SN po stronie ipsilateralnej, gdy podawane są ze stosunkowo niską dawką L-DOPA. Badania te pokazują również, że w obecności donora NO znacznie dłużej utrzymuje się podwyższony poziom DA w STR i SN po stronie ipsilateralnej, co może wpływać na lepszą koordynację funkcjonalną tych struktur.

W badaniach tych wykazano również, że chroniczne podania L-DOPA (25 mg/kg) w kombinacji z molsidominą (2 mg/kg) nieznacznie podnoszą obniżone przez podania samej L-DOPA stężenie 5-HT w STR i SN oraz osłabiają nasilony przez nią katabolizm. Z kolei po chronicznych podaniach wyższej dawki molsidominy (4 mg/kg) z tą samą dawką L-DOPA stężenie 5-HT w STR i SN było istotnie wyższe, a jej katabolizm mniej intensywny niż w

grupie otrzymującej samą L-DOPA. Badania te pokazują, że niskie dawki donora NO, molsidominy mogą modulować zarówno zachowanie asymetryczne zwierząt, jak i tkankowe stężenia DA i 5-HT w STR i SN po stronie ipsilateralnej u szczurów z jednostronnie uszkodzonym układem czarnoprążkowiowym otrzymujących chronicznie L-DOPA.

W kolejnych badaniach wykazano, że chroniczne podania molsidominy (2 mg/kg) i L-DOPA (25 mg/kg), oddzielnie lub w kombinacji nie zmieniały poziomu białka nNOS w ipsilateralnym STR. Chronicznie podawana molsidomina nie zmieniała również ekspresji białka sGC w tej strukturze, natomiast chroniczne podania L-DOPA samej lub w kombinacji z molsidominą obniżały ekspresję tego białka. Ekspresja białka PDE-1B w ipsilateralnym STR była istotnie niższa w porównaniu do kontroli we wszystkich grupach 6-OHDA otrzymujących badane leki, jak również w grupie 6-OHDA otrzymującej rozpuszczalnik. Badane leki modulowały w odmienny sposób ekspresję białek nNOS, sGC i PDE1-B w ipsilateralnej SN. Ekspresja białek nNOS i PDE-1B była znamienne obniżona w ipsilateralnej SN w grupach 6-OHDA otrzymujących chronicznie rozpuszczalnik lub molsidominę w porównaniu do grupy kontrolnej. Chronicznie podawana L-DOPA przywracała w tej strukturze ekspresję białek nNOS i PDE1B do poziomu grupy kontrolnej. Z kolei po łącznych podaniach molsidominy i L-DOPA poziom białka nNOS był nadal obniżony, natomiast poziom białka PDE-1B nie różnił się istotnie od grupy kontrolnej. W ipsilateralnym STR i SN ekspresja białka sGC ulegała obniżeniu po chronicznych podaniach L-DOPA.

W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że neurony TH-ir znajdujące się głównie w części zbitej SN stanowią około 37% wszystkich neuronów tej struktury barwionych CV. W grupach otrzymujących 6-OHDA, po 4 tygodniach od podania toksyny, neurony te ulegały 95-98 % degeneracji w ipsilateralnej SN. Chroniczne podania badanych leków nie zmieniały ilości neuronów TH-ir w SN. Wykazano również, że neurony nNOS-ir znajdują się głównie w części siateczkowatej SN i stanowią około 65-70% wszystkich neuronów barwiących się CV. Degeneracja neuronów dopaminergicznych w ipsilateralnej SN prowadziła do 25% spadku ilości neuronów nNOS-ir w tej strukturze. Chroniczne podania L-DOPA (25 mg/kg) osobno lub w kombinacji z molsidominą (2 mg/kg) nie wywoływały dalszych zmian w ich liczebności.

Analiza stereologiczna objętości SN wykazała, że wskutek degeneracji neuronów dopaminergicznych dochodziło do istotnego zmniejszenia się objętości tej struktury po stronie ipsilateralnej (o ok. 20%). Pod wpływem chronicznych podań L-DOPA objętość ipsilateralnej SN ulegała znamiennej powiększeniu w porównaniu do strony kontralateralnej. Łączne

podania molsidominy (2 mg/kg) i L-DOPA (25 mg/kg) wyrównywały objętość tej struktury pomiędzy stronami. Analiza stereologiczna ilości neuronów w STN wykazała obecność około 13,000 neuronów nNOS-ir. Podwójne barwienie z użyciem CV i przeciwciała anti-nNOS ujawniło występowanie nNOS we wszystkich neuronach tej struktury. Chroniczne podania L-DOPA nie wywoływały zmian w objętości tej struktury.

W barwieniu histochemicznym na aktywność NADPH-diaforazy wykazano brak aktywności tego enzymu w SN, niewielką aktywność w STN oraz bardzo dużą aktywność w STR. W tej ostatniej strukturze barwienie immunohistochemiczne interneuronów nNOS pokrywało się z barwieniem histochemicznym na aktywność NADPH-diaforazy.

W drugiej serii doświadczeń z użyciem inhibitorów nNOS wykazano, że selektywny inhibitor tego enzymu 7-NI hamował aktywność lokomotoryczną już w ciągu pierwszych 10 min pomiaru zarówno zwierząt kontrolnych, jak i tych z jednostronnie uszkodzonym układem czarnoprążkowiowym. Po podaniach L-NAME, nieselektywnego inhibitora nNOS, w tym samym czasie nie stwierdzono zmian w aktywności lokomotorycznej zwierząt kontrolnych, natomiast w grupie 6-OHDA obserwowano zahamowanie tylko jednego z mierzonych parametrów. Te rozbieżności mogą wynikać z różnic w farmakokinetyce obu badanych związków, zwłaszcza, że oba inhibitory wywoływały silną katalepsję 30 min po podaniu zarówno w grupie zwierząt kontrolnych jak i tych z jednostronnie uszkodzonym układem czarnoprążkowiowym.

Inhibitory te wpływały też w odmienny sposób na metabolizm DA i 5-HT w badanych strukturach dopaminergicznych w grupie zwierząt kontrolnych. Godzinę po podaniu drugiej dawki 7-NI stwierdzono wzrost tkankowego stężenia DA w STR, natomiast w SN obserwowano tylko tendencję wzrostową. W obu strukturach tkankowe stężenia metabolitów DA (DOPAC i HVA) ulegały obniżeniu. 7-NI zwiększał również stężenie 5-HT w STR i SN. W przeciwieństwie do 7-NI, L-NAME nie wywoływał żadnych zmian w stężeniu DA i jej metabolitów ani 5-HT w badanych strukturach mózgu.

Wykazano również, że czas trwania rotacji kontralateralnych w grupie zwierząt z jednostronnie uszkodzonym układem czarnoprążkowiowym otrzymujących drugą dawkę 7-NI łącznie z ostatnią chroniczną dawką L-DOPA (25 mg/kg) był znacznie dłuższy (320 min) niż w grupie otrzymującej tylko L-DOPA (180 min). Ponadto w grupie otrzymującej oba leki największe natężenie rotacji miało miejsce między 100-180 min, czyli w czasie kiedy rotacje po samej L-DOPA ulegały samoistnemu wygaszeniu. W przeciwieństwie do 7-NI, L-NAME nie zmieniał czasu trwania rotacji kontralateralnych indukowanych chronicznymi podaniami

L-DOPA. Co więcej, intensywność tych rotacji w grupie otrzymującej oba leki była nieco niższa niż w grupie otrzymującej samą L-DOPA.

Stężenia DA w ipsi- i kontralateralnym STR i SN w grupie zwierząt otrzymujących 7-NI w kombinacji z L-DOPA (25 mg/kg) były znacząco wyższe niż w grupie otrzymującej tylko L-DOPA. Ponadto w grupie tej wzrostowi poziomu DA towarzyszył spadek stężenia metabolitów DA oraz osłabienie jej katabolizmu mierzonego stosunkiem stężeń DOPAC/DA i HVA/DA w porównaniu do grupy otrzymującej samą L-DOPA, w której obserwowano wysokie stężenie metabolitów i nasilony katabolizm DA. W przeciwieństwie do 7-NI, L-NAME podawany w kombinacji z L-DOPA obniżał stężenie DA w ipsilateralnym STR w porównaniu do grupy otrzymującej samą L-DOPA. Również stężenia metabolitów DA były niższe zarówno w STR jak i SN, natomiast wartości wskaźników metabolicznych nie różniły się istotnie w porównaniu do grupy otrzymującej tylko L-DOPA. Badane inhibitory nNOS w odmienny sposób modulowały poziom 5-HT obniżany przez chronicznie podawaną L-DOPA. Łączne podanie 7-NI i LDOPA zwiększało poziom 5-HT w obu badanych strukturach natomiast łączne podanie L-NAME i L-DOPA nie wywoływało tego efektu.

W prezentowanych powyżej badaniach wykazano, że podniesienie poziomu DA obserwowane po podaniu 7-NI nie jest cechą wspólną inhibitorów NOS, ale szczególną własnością tego związku wynikającą najprawdopodobniej z efektu hamowania rozkładającego DA enzymu, monoaminooksydazy typu B. Stąd też opisywane w literaturze korzystne efekty 7-NI w modelach PD nie wynikają ze zmniejszonej syntezy NO, ale z ograniczenia katabolizmu DA wskutek zahamowania aktywności tego enzymu. W oparciu o efekty obserwowane po podaniach L-NAME można raczej wątpić, że zastosowanie inhibitorów nNOS mogłoby mieć korzystny wpływ w terapii PD.

Szereg przedstawionych wyników składających się na niniejszą pracę wskazuje, że w poszukiwaniu nowych form terapii PD warto zwrócić uwagę na modulujący wpływ NO na funkcję jąder podstawy. NO i związana z nim ścieżka sygnałowa NO-sGC-sGMP w prążkowiu odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu funkcji motorycznych, więc jej modulowanie może odegrać znaczącą rolę w terapii PD.