



Udział leptyny w procesie gojenia się okołoporodowych uszkodzeń mózgu

Agnieszka Kaliszek Kiniorska

Rozprawa doktorska

promotor:

Prof. dr hab. n. med. Danuta Maślińska

Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej
II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2018

7. Streszczenie

Proces zapalny jest istotną częścią strategii obronnej ustroju i towarzyszy każdemu uszkodzeniu tkanki. Zadaniem procesu zapalnego jest przywrócenie homeostazy tkankowej. Zadanie to jest realizowane w dwóch etapach podczas, których następuje usunięcie martwych komórek oraz wypełnienie powstałego ubytku blizną. Przebieg procesu zapalnego jest modulowany przez szereg substancji endogennych o działaniu zarówno prozapalnym jak i przeciwzapalnym. Poznanie i scharakteryzowanie roli tych substancji w mózgu rozszerza możliwości skojarzonej interwencji terapeutycznej oraz stwarza podstawy do poszukiwania nowych, skutecznych leków. W dostępnej literaturze wiele miejsca poświęca się zjawisku cytoprotekcji, której zadaniem jest ochrona komórek leżących w otoczeniu pierwotnego ogniska martwiczego (obszar penumbry). Leki i substancje endogenne działające cytoprotekcyjnie pozwalają więc na interwencję w początkowy etap procesu zapalnego, zanim ognisko martwicze ulegnie demarkacji. Możliwość modulowania lekowego następnych etapów procesu zapalnego w mózgu (rozbiórka i ewakuacja uszkodzonych tkanek, proces tworzenia się blizny) są stosunkowo mało poznane. W ostatnich latach wykryto szereg nowych substancji, które skutecznie wpływają na przebieg tych etapów procesu zapalnego w tkankach obwodowych, do nich należy leptyna. Leptyna jest białkiem wykrytym i scharakteryzowanym stosunkowo niedawno. Pod koniec 1994 roku wyizolowano gen ob u myszy a następnie u człowieka. Początkowo sądzono, że leptyna produkowana jest jedynie przez komórki tłuszczowe oraz, że jej rola sprowadza się głównie do regulowania zasobów energetycznych ustroju. W późniejszych badaniach wykazano wpływ leptyny na wiele procesów fizjologicznych (prolifercja komórek krwiopochodnych szpiku, ciąża, rozwój płodu, proces wzrostu i osobniczego dojrzewania płciowego). O wpływie leptyny na proces gojenia się uszkodzeń mózgu wiadomo niewiele. Wiadomo, że białko to przyspiesza proces gojenia się ran na obwodzie, w skórze i przewodzie pokarmowym. W mózgu rola leptyny została poznana fragmentarycznie. Wiadomo, że białko to wiąże się ze swoistym receptorem leptynowym, zlokalizowanym na komórkach nerwowych ośrodkowej sytości w podwzgórzu, regulując ilość przyjmowanego pokarmu. Wykryto kilka izoform białka receptorowego, sugerując jednocześnie, że tylko długołańcuchowa forma (Ob-Rb) warunkuje możliwość przekazywania sygnału do struktur efektorowych komórki. Pozostałe izoformy receptorowego białka leptynowego uczestniczą w transporcie leptyny przez barierę krew-mózg oraz w usuwaniu leptyny z krwiobiegu.

Celem podjętych badań było poszukiwanie odpowiedzi na następujące pytania:

- Jaki jest poziom leptyny w surowicy krwi zwierząt, które uległy asfiksji w wyniku zastosowania określonego modelu doświadczalnego, naśladującego okołokoprodowe uszkodzenia mózgu u przedwcześnie uszkodzonych dzieci?
- Czy komórki glejowe, uczestniczące w odczynie zapalnym i w procesie gojenia się uszkodzeń mózgu, wykazują obecność receptorów leptynowych, zdolnych do wiązania leptyny?
- Czy podanie parenteralne rekombinowanej leptyny ma wpływ na rozległość uszkodzeń mózgu, wywołanych przez asfiksję oraz na nasilenie reakcji komórek glejowych uczestniczących w zapaleniu i gojeniu się uszkodzeń?

Po upływie dwóch tygodni od zabiegu w niedokrwionej półkuli mózgu występowały różnej wielkości jamiste zmiany obejmujące część lub prawie całą korę mózgu w obrębie płata czołowego, ciemieniowego i skroniowego a czasem potylicznego. Jamy powstające w obrębie kory mózgowej pokryte były z zewnątrz przez pogrubiałe opony mózgu. U wielu zwierząt jamy te łączyły się z jamą komory bocznej mózgu.

W najcięższych uszkodzeniach widoczne były rozległe ogniska martwicy w zwojach podstawy mózgu. W przeciwległej, do uszkodzonej półkuli mózgu, (która podlegała jedynie działaniu niedotlenienia), nie znaleziono zmian morfologicznych, ta półkula mózgu jest traktowana przez wielu autorów jako „półkula kontrolna”.

Kolejnym etapem było badanie poziomu leptyny w surowicy krwi. U zwierząt kontrolnych podczas drugiego i trzeciego tygodnia życia po porodzie (od 8 do 21 dnia życia) poziom leptyny w surowicy krwi tych zwierząt był wysoki. Wyniki te są zgodne z wynikami prac publikowanych na ten temat przez innych autorów. U zwierząt po asfiksji poziom leptyny w surowicy krwi był statystycznie znamienne niższy, niż u zwierząt kontrolnych, szczególnie w 10, 12 i 14 dniu życia.

Przy pomocy badań immunohistochemicznych zidentyfikowano receptorowe białka leptynowe. Wokół jam i ognisk martwicy w uszkodzonej półkuli mózgu znajdowały się liczne komórki wykazujące bardzo silną immunoaktywność w reakcji z przeciwciałem wyprodukowanym przeciw receptorowemu białku leptynowemu Ob-R (M-18). Badania immunohistochemiczne identyfikujące typ tych komórek, wykazały, że są to komórki glejowe o cechach zarówno mikro – jak i astro – gleju. Ten typ komórek występował jedynie w uszkodzonej półkuli mózgu. U żadnego ze zwierząt, które podlegały wpływowi asfiksji i otrzymywały leptynę, nie znaleziono zmian jamistych. U wszystkich tych zwierząt w półkuli mózgu po stronie uszkodzonej występowały jednak w korze liczne ogniska ubytków neuronalnych wypełnione komórkami glejowymi, barwiącymi się silnie w reakcji z przeciwciałem anti-GFAP.

Reakcja astroglejowa w uszkodzonej półkuli mózgu była bardziej nasiloną a rozległość jej większa niż u zwierząt, które nie otrzymały leptyny.

Masa ciała zwierząt badanych zarówno po asfiksji jak i po podaniu leptyny nie ulegała statystycznie istotnym wahaniom. Masa mózgu była natomiast statystycznie istotnie niższa po asfiksji, a po podaniu leptyny była zbliżona do masy mózgu zwierząt kontrolnych. Masa uszkodzonych półkul mózgu po asfiksji była statystycznie znamienne niższa niż masa półkul po nieuszkodzonej stronie mózgu (kontrolnej), natomiast po podaniu leptyny nie obserwowano takich różnic.

Oddziaływanie leptyny na uszkodzony mózg szczura uzasadnia wykryta w pracy obecność receptorowego białka leptynowego na reaktywnych komórkach glejowych. Białko to występuje w dwóch izoformach receptorowych, z których jedna – długa forma receptora może być odpowiedzialna za cytoprotekcyjne oddziaływanie leptyny w badanym modelu niedokrwienno/niedotlenieniowym mózgu szczura.

Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań wysnułam następujące wnioski:

1. Doświadczalne niedokrwienie/niedotlenienie mózgu w okresie okołoporodowym zaburza dynamikę zmian poziomu leptyny we krwi obserwowaną u zwierząt kontrolnych.
2. Doświadczalne niedokrwienie/niedotlenienie doprowadza w uszkodzonych półkulach mózgu do pojawienia się ekspresji receptorowego białka leptynowego na reaktywnych komórkach glejowych.
3. Receptorowe białko leptynowe w uszkodzonych półkulach mózgu występuje w dwóch izoformach – długiej i krótkiej.
4. Suplementacja leptyną zwierząt z uszkodzonym mózgiem zmniejsza rozległość zmian i nasila reakcję glejową.
5. Neuroprotekcjna rola leptyny jest reakcją swoistą (białko-receptor) modelującą przebieg procesu gojenia i zapobiegającą powstawaniu zmian jamistych w mózgu.

8. Summary

The role of leptin in the process of healing perinatal brain damage

The inflammatory process is an important part of the defense strategy of the human body and accompanies any tissue damage. The aim of the inflammatory process is to restore tissue homeostasis. This activity is carried out in two stages during which the necrotic cells are removed and the resulting cavity is filled with a scar. The course of the inflammatory process is modulated by a series of endogenous substances with both pro- and anti-inflammatory effects. Understanding and characterizing the role of these substances in the brain extends the possibilities of combined therapeutic intervention and draws the bottomline for searching new and effective drugs. Vast portion of available literature refers to the phenomenon of cytoprotection. The role of cytoprotection is to guard the cells lying in the proximity of the original necrotic focus (the penumbra area). Drugs and endogenous substances that demonstrate cytoprotective activity allow to intervene in the initial stage of the inflammatory process before the necrotic focus is demarcated from the viable brain tissue. There is not much known about the possible drug modulation of the consequent stages of the inflammatory process in the brain (i.e. degradation and evacuation of damaged tissues, the process of scar formation). A number of new substances have been detected in recent years that effectively influence the course of these stages of the inflammatory process in peripheral tissues. Leptin is one of them.

Leptin is a protein that has been identified and characterized relatively recently. In the end of 1994 the *ob* gene was isolated in mice and then in humans. Initially, it was thought that leptin is produced only by fat cells and that its role is mainly to regulate the energy resources of the body. In later studies, the effect of leptin on many physiological processes (proliferation of bone marrow hematopoietic cells, pregnancy, fetal development, growth and determining sexual maturation) has been demonstrated.

There is not much known about the influence of leptin on the healing process of brain lesions. It has been demonstrated that this protein accelerates the process of healing in peripheral areas of the skin and digestive tract wounds.

The role of leptin in the brain has been discovered only partially. It is known that this protein binds to a specific leptin receptor located in the nerve cells of the satiety center in the hypothalamus, regulating the amount of food intake. Several isoforms of the receptor protein have been discovered, suggesting at the same time that only the long-chain form (Ob-Rb) determines the possibility of signal transduction to the effector structures of the cell. The remaining isoforms of the leptin receptor protein participate in the leptin transportation across the blood-brain barrier and in leptin removal from the bloodstream.

The objective of the research was to find the answers to the following questions:

- What is the level of blood serum leptin in the animals that have been asphyxiated as a result of a specific experimental model mimicking perinatal brain damage in prematurely born children?
- Do glial cells involved in the inflammatory reaction and in the process of healing of brain lesions show the presence of leptin receptors capable to bind leptin?
- Does the parenteral administration of recombinant leptin affect the extent of brain damage induced by asphyxia and the severity of the response of glia cells involved in inflammation and healing of lesions?

Cavernous lesions of various size were observed in the ischemic hemisphere of the brain following two weeks of the asphyxia incident. It included part or almost all of the cerebral cortex within the frontal, parietal and temporal lobes, and sometimes occipital lobes. The cavities being formed in the cerebral cortex were covered by thickened brain meninges. In many animals, these cavities were communicated with the cavity of the lateral ventricle. The extensive areas of necrosis in the basal ganglia were observed in the most severe lesions. No morphological changes were found in the hemisphere of the brain that was opposite to the damaged one (i.e. the one that was exposed only to hypoxia). This hemisphere of the brain is treated by many authors as a „control hemisphere”. The next step was to observe the level of leptin in the blood serum. The blood serum level of leptin in control animals was high during the second and third week of life (from 8 to 21 after delivery). These results are consistent with the articles on this topic published by the other authors. The serum leptin levels were statistically significantly lower in animals after asphyxiation in comparison to the animals from control group. It was especially evident 10, 12 and 14 days after the delivery. The leptine receptor proteins were identified by use immunohistochemical methods. There were numerous cells showing very strong immunoreactivity to the antibody produced against the Ob-R receptor protein (M-18). The cells were identified around the necrotic cavities and necrotic foci in the damaged hemisphere. Immunohistochemical tests performed to identify the type of these cells unveiled that they were glial cells with both micro- and astroglia features. This cell type only occurred in the damaged hemisphere of the brain. The cavernous lesions of the brain were found in none of the animals that were subject of asphyxia followed by leptin administration. However in all of these animals there were numerous foci of neuronal defects in the cortex of the damaged hemisphere that were filled with glial cells staining vigorously in response to the anti- GFAP Ab. The astroglial reaction in the damaged hemisphere of the brain was more intense and its range was greater than in animals that did not receive leptin. The body weight of animals examined after asphyxiation and administration of leptin was not subject to statistically significant fluctuations.

The weight of the brain was statistically significantly lower after asphyxia but it trended to approach the mass of the brains of the animals from the control group after leptin administration. The mass of damaged hemispheres of the brain after asphyxia was statistically significantly lower than the mass of hemispheres on the intact side of the brain (control group), but no such differences were observed after leptin administration.

The presence of leptin receptor protein on reactive glial cells explains the impact of leptin on the injured rat brain that has been documented in current studies. This protein occurs in two receptor isoforms, one of which is a long form of the receptor that may be responsible for the neuroprotective effect of leptin in the ischemic / hypoxic model of the brain.

Following my research have I made the following conclusions:

1. Experimental ischemia / hypoxia in the perinatal period disturbs the dynamics of changes in blood leptin levels observed in the control group of animals.
2. Experimental ischemia / hypoxia evokes the expression of leptin receptor protein on reactive glial cells in the damaged hemispheres of the brain.
3. The leptin receptor protein in the damaged hemispheres of the brain occurs in two isoforms - long and short.
4. Leptin supplementation of animals with brain damage reduces the extent of lesions and the surge of glial response.
5. The neuroprotective effect of leptin is a specific (protein-receptor) reaction modeling the healing process and preventing the formation of cavernous changes in the brain.