

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Tryptofán kynurenínová signálna dráha v tauopátiách a jej neuroprotektívna úloha s využitím v terapii

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): kynurenín, kynurenínová kyselina, tauopátie, neurozápal

Účel projektu: Základný výskum

Podrobný účel postupu:

Tauopátie, medzi ktoré patrí aj Alzheimerova choroba, predstavujú heterogénnu skupinu progredujúcich neurodegeneratívnych ochorení. Z histopatologického hľadiska je hlavným znakom tauopátií prítomnosť vnútrobunkových neurofibrilárnych kĺbkov tvorených abnormálne fosforylovanou a agregovanou formou tau proteínu (Zilka a kol., 2009; Ferrer a kol., 2014).

Proces neurodegenerácie je v súčasnosti spájaný s prítomnosťou chronického neurozápalu.

Žilka a kol. (2009) použitím transgénneho potkanieho modelu pre tauopátie ukázali, že neurofibrilárna patológia je schopná vyvolať proliferáciu a aktiváciu imunitných buniek mozgu - mikroglíí a astrocytov, a to pravdepodobne uvoľnením patologicky modifikovaných foriem tau proteínu do extracelulárneho prostredia. V oblastiach neurofibrilárnej patológie bola popísaná aktivácia mikroglíí, zvýšená expresia špecifických mikroglíálnych markerov CD11a, CD11b, CD18, CD4, CD45 a CD68, ako i produkcia prozápalových molekúl cytokínov a chemokínov. Neurofibrilárne kĺbká boli asociované so zvýšenou expresiou prozápalových molekúl TNF- α , IL-6, IL-1 β a MCP-1, ktoré sú spájané predovšetkým s poškodením mozgovo cievnej bariéry (DiPatre a kol., 1997; Kováč a kol., 2011; Sheffield a kol., 2000).

Rozvojom metód analytickej chémie, proteomiky a metabolomiky máme možnosť detailne študovať procesy, ktoré môžu viesť k vzniku neurofibrilárnej patológie resp. môžu byť jej dôsledkom a stať sa tak dôležitými pre rozvoj nových a účinných terapií.

Patrí sem i štúdium kynurenínovej signálnej dráhy. V procese neurodegenerácie Alzheimerovej choroby, Parkinsonovej choroby, Huntingtonovej choroby a iných dochádza k porušeniu špecifickej dráhy metabolizmu tryptofánu. L-tryptofán patrí medzi esenciálne aminokyseliny. Zúčastňuje sa syntézy proteínov a je prekursorom mnohých bioaktívnych molekúl. Približne 2% celkového množstva tryptofánu sú metabolizované prostredníctvom dráhy syntézy serotonínu. Naopak väčšina tryptofánu vstupuje do metabolickej dráhy kynurenínu za vzniku L-kynurenínu, ktorý je v ďalších krokoch metabolizovaný za vzniku neuroprotektívnej kynurenínovej kyseliny alebo naopak neurotoxickej quinolínovej kyseliny a NAD (nikotínamid adenín dinukleotid) molekúl (Vecsei a kol., 2013).

Kynurenínová kyselina je produkovaná prevažne astrocytmi a neurónmi, naopak na produkcii quinolínovej kyseliny sa podieľajú zápalom aktivované mikroglie. Kyseliny sú schopné viazať sa na glutamátové receptory. Quinolínová kyselina pôsobí ako agonista NMDA receptorov a vedie k vzniku prozápalovej reakcie. Quinolínová kyselina iniciuje zvýšenú produkciu voľných kyslíkových radikálov ako i prozápalových cytokínov a chemokínov, napríklad MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) a RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted). Naopak kynurenínová kyselina má úlohu endogénneho antagonistu NMDA receptorov, pôsobí neuroprotektívne a je schopná redukovať excitotoxické poškodenie centrálnej nervovej sústavy (Guillemin a kol., 2001; 2007; Vecsei a kol., 2013).

V súvislosti s Alzheimerovou chorobou bolo v porovnaní s kontrolnými jedincami popísané zvýšené množstvo kynurenínu v krvi a cerebrospinálnej tekutine pacientov. Zvýšená koncentrácia

quinolínovej kyseliny bola nájdená v kortikálnych a hipokampálnych neurónoch, v oblastiach postihnutých neurofibrilárnou patológiou. Stimulácia neurónov quinolínovou kyselinou vedie k zvýšenej regulácii génov zúčastňujúcich sa na abnormálnej hyperfosforylácii tau proteínu (Gulaj a kol., 2010; Kincses a kol., 2010) a môže mať úlohu v tvorbe neurofibrilárnej patológie.

Galba a kol. (2016) využitím SHR24 transgénneho potkanieho modelu pre tauopátie detekovali znížené množstvo kynurenínu v krvnej plazme, čo môže naznačovať zvýšený transport kynurenínu do mozgu cez mozgovo-cievnu bariéru, kde môže byť metabolizovaný za vzniku kynurenínovej resp. quinolínovej kyseliny.

Ovplyvnenie metabolizmu kynurenínu smerom k produkcii neuroprotektívnej kyseliny kynurenínovej by sa mohlo stať základom vzniku nových terapeutických stratégií resp. účinnej prevencie voči neurodegeneráciám. V súčasnosti už existuje niekoľko možných terapeutík založených na analógoch neuroprotektívnej kynurenínovej kyseliny resp. inhibítoroch produkcie quinolínovej kyseliny. Inú skupinu terapeutík tvoria inhibítory kynurenín hydroxylázy. Podporujú tvorbu kynurenínovej kyseliny, redukujú proces neurodegenerácie a znižujú tvorbu quinolínovej kyseliny v krvi i mozgu.

Hlavným cieľom nášho projektu bude ovplyvniť metabolizmus tryptofánu smerom k produkcii neuroprotektívnej kyseliny kynurenínovej a tak inhibovať, spomaliť proces neurodegenerácie v animálnom modeli pre tauopátie. Popíšeme vzťah medzi procesom neurodegenerácie a tryptofán-kynurenínovou signálnou dráhou. Naším výskumom v *in vivo* modeloch by sme mohli prispieť k vytvoreniu nových terapeutických postupov s možným prínosom pre klinickú prax.

Pre splnenie cieľov projektu využijeme syntetické deriváty neuroprotektívnej kyseliny kynurenínovej. Použijeme syntetický derivát kyseliny kynurenínovej (N-(2-N,N-dimethylaminoethyl)-4-oxo-1H-quinolín-2-karboxamid hydrochlorid), ktorý sa ukázal byť účinný v oblasti terapie iných neurodegeneratívnych ochorení. Aplikovaním uvedeného derivátu ovplyvníme metabolickú dráhu tryptofánu s cieľom inhibovať, spomaliť proces neurodegenerácie v animálnom modeli pre tauopátie. Experimenty budú prebiehať na *in vivo* úrovni.

Pre splnenie vytýčených cieľov použijeme nami vytvorený SHR24 transgénny potkaní model pre tauopátie, ktorý je charakteristický prítomnosťou progresívnej neurofibrilárnej patológie. **Tieto transgénne modely exprimujú skrátenú formu tau proteínu (3R tau,151-391) obsahujúcu 3R mikrotubuly väzobné domény a prolín bohatú oblasť. U tejto línie transgénnych potkanov dochádza k progresívnej neurofibrilárnej patológii, avšak k objaveniu neurofibrilárnej spleti dochádza až vo veku 9 mesiacov (Filipčík et al., 2010). Nástup miernych príznakov fenotypu sa môže začať objavovať od 6 mesiaca veku, kedy dochádza k postupnej miernej strate hmotnosti (väčšinou prítomná od 8mes) a k slabosti zadných končatín, tzv. “pre-terminálne“ štádium, ktoré pretrváva až do 9 mesiacov veku. Zvieratá v projekte budú použité v tomto pre-terminálnom štádiu, nenechajú sa prežívať do tzv. „terminálneho štádia“, do rozvoja príznakov škodlivého fenotypu.**

Využijeme i nami zavedené vysoko citlivé analytické metódy z oblasti metabolomiky a štúdia biomarkerov ako i bohaté skúsenosti v oblasti štúdia neurodegenerácií, neurozápalu.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Cieľom projektu bude analýza vplyvu neuroprotektívneho analógu kyseliny kynurenínovej na neurofibrilárnu patológiu ako i neurozápalové zmeny asociované s ochorením. Pre experimenty použijeme potkaní animálny model pre tauopátie SHR24. Uvedený transgénny model je charakteristický prítomnosťou progresívnej neurofibrilárnej patológie v oblasti mozgového kmeňa a frontálneho kortexu. Efekt analógu budeme sledovať predovšetkým na biochemickej úrovni. Budeme používať biochemickú western blot analýzu a imunohistochemiu. Zápalové zmeny budeme stanovovať pomocou multiplex analýzy a imunohistochemického farbenia. Mozgové tkanivo a plazma budú použité i pre následnú metabolomickú analýzu. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:

Celkovo bude použitých 20 **GMO** potkanov v predterminálnom štádiu. Použijeme 6 mesiacov staré potkany (samice): 10 transgénnych SHR24 potkanov a 10 kontrolných zvierat. Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Zvieratá budú uvedené do hlbokjej anestézie **s odberom krvi z vena cava** a po transkardiálnej perfúzii im bude odobraté mozgové tkanivo.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Dožitie GMO potkanov do veku 6 mesiacov	Táto transgénna línia potkanov má postupný, pomalý nástup patológie, v mladom veku sa na zvieratách neprejavujú známky škodlivého fenotypu. Prvé príznaky sa môžu začať objavovať od 6 mesiaca veku v podobe len mierneho a postupného znižovania hmotnosti (väčšinou prítomné od 8mes), slabosťou zadných končatín –tzv. „pre-terminálne štádium“, ktoré pretrváva od 6-9 mesiacov veku	slabá
Handling	2-týždne pred plánovaným začatím aplikácie látky, experimentátor denne chodí za zvieratami, aby si zvieratá naňho privykli a minimalizoval stres zvierat..	slabá
Intraperitoneálne podávanie účinnej experimentálnej látky	Opakovaný, krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.	stredná
Prežívanie potkanov počas aplikácie experimentálnej látky	Zvieratám bude podávaný derivát kyseliny kynurenínovej – KYNA1, raz do týždňa intraperitoneálne, v objeme 200ul, bude pripravovaný v sterilnom prostredí, aby sa zabránilo nožnej infekcii zvierat. Podľa informácií dostupných v literatúre podávanie KYNA1, nespôsobovalo žiadne vážne vedľajšie účinky. V tomto období sa u týchto transgénnych potkanov začínajú postupne vyvíjať len mierne prejavy fenotypu v podobe mierneho poklesu hmotnosti a slabosti zadných končatín. Zvieratá sú schopné samostaného pohybu, príjmu krmiva a vody. Sú pravidelne sledované a hodnotí sa zdravotný stav na základe bodového skóre. V prípade objavovania sa nečakane agresívneho fenotypu sa bezodkladne pristúpi ku humnánemu usmrteniu zvierat v celkovej anestézii.	Slabá - stredná
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna	Jednorázové podanie anestetika. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou	slabá

injekcia anestetík	a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.	
Transkardiálna perfúzia	Štandardná metóda. Zviera sa v celkovej anestézii transkardiálne perfunduje štandardným roztokom s následným odberom vzoriek	stredná
Celkové hodnotenie krutosti štúdie		stredná

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie: Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné štandardné pracovné postupy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociálnym potrebám. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. Vo zverinci je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat.

Zdravotný stav každého zvieraťa bude hodnotený pri každom pozorovaní na základe hlavných štyroch znakov: *letargie (lethargy), hrbenia (hunching), naježenej srsti (piloerection), straty váhy >15 % očakávanej hmotnosti (weight loss). Hodnotenie jednotlivých znakov je uvedený v tabuľke human end point.

Pri prejavoch zmien zdravotného stavu veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humánnemu usmrteniu zvieraťa.

Redukcia: V navrhovanom experimente budeme využívať zvieratá z vlastného chovu. Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo živého mozgového tkaniva animálnych modelov za poznatky, ktoré pochádzajú z *in vitro* experimentov. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme nenašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách. Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokjej anestézii. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pochopeniu patologických procesov v CNS.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.3. 2020 a bude sa realizovať do 1.6. 2020.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie (podľa Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.).