

**„Wpływ różnic w aktywności lokomotorycznej i reaktywności stresowej u szczurów na rozwój zaburzeń kognitywnych i depresyjnych oraz efektywność terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 w streptozotocynowym modelu choroby Alzheimera”**

**mgr Joanna Dunacka**

Choroba Alzheimera (AD) jest postępującym zaburzeniem neurodegeneracyjnym występującym w dwóch postaciach: rodzinnej (fAD) oraz sporadycznej (sAD). Postać fAD wywoływana jest przez mutacje w genach sprzyjających odkładaniu się  $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) w mózgu i diagnozowana jest tylko u 5% pacjentów z AD. Postać sAD dotyczy aż 95% wszystkich osób cierpiących na AD, a przyczyny występowania tej formy choroby są zróżnicowane i obejmują: kaskadę ( $\beta$ A), neurozapalenie, stres oksydacyjny, zaburzenia funkcjonowania szlaków insulinowych i dróg cholinergiczych. W przebiegu AD obserwowane są liczne zmiany behawioralne tj. zaburzenia kognitywne, lękowe oraz depresyjne, które są następstwem akumulacji w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) dwóch patologicznych form białek: blaszek starczych (zbudowanych z  $\beta$ A) oraz splątków neurofibrylarnych (zbudowanych z hiperfosforylowanego białka tau). Zwierzęcym modelem sAD jest podanie streptozotocyny (STZ) do komór bocznych mózgu (ICV). W tym modelu choroby obserwuje się spadek metabolizmu glukozy, a to przyczynia się do rozwinięcia: insulinooporności, spadku liczby neuronów i zakłócenia procesu neurogenezy, zaburzenia funkcjonowania szlaków cholinergiczych, obecności złogów  $\beta$ A, deficytów pamięci przestrzennej oraz wystąpienia zaburzeń depresyjnych/lękowych. Jedną z substancji przywracających fizjologiczne działanie szlaków insulinowych jest insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1). Neurotrofina ta poprzez regulację metabolizmu glukozy korzystnie wpływa na: neuroprotekcję, neurogenezę, neuroregenerację, wspieranie gleju, neuroplastyczność a także działa jako środek przeciwłękowy.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki są oparte na 3 artykułach naukowych (Dunacka i wsp., 2024; 2025a; 2025b) oraz części wyników nieopublikowanych. Eksperymenty przeprowadzone przeze mnie skupiały się na zbadaniu czy osobnicze różnice w reaktywności stresowej u szczurów mają wpływ na rozwój zaburzeń towarzyszących sAD (zaburzenia kognitywne/neuropsychiatryczne, aktywacja mikrogleju/akumulacja  $\beta$ A i obwodowe zapalenie) oraz na efektywność terapii z użyciem neurotrofiny IGF-1 podanej dokomorowo.

Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem samców szczurów Wistar Han niezróżnicowanych i zróżnicowanych pod względem poziomu aktywności lokomotorycznej/reaktywności stresowej (test nowości w warunkach bazalnych) na osobniki wysokoaktywne ruchowo (HR) vs. niskoaktywne ruchowo (LR) (ogólna liczba N=72; w tym

szczurów HR N=35; w tym szczurów LR N=35). W warunkach bazalnych (przed implantacją kaniul i iniekcjami) określono poziom pamięci przestrzennej (test labiryntu wodnego Morrisa - MWM), zaburzeń lękowych (test uniesionego labiryntu krzyżowego - EPM i test jasno oświetlonego otwartego pola - OF) oraz poziom anhedonii - podstawowego wskaźnika zaburzeń depresyjnych (test preferencji sacharozy - SPT) u tych osobników. Następnie zaindukowano u zwierząt model sAD poprzez iniekcje ICV-STZ (3 mg/kg) lub wraz z indukcją choroby szczurom podawano także neurotrofinę ICV-IGF-1 (2 µg). Grupy kontrolne szczurów stworzono poprzez dokomorowe podanie buforu cytrynianowego (ICV-VEH, rozpuszczalnik STZ) oraz przez iniekcje fizjologicznego roztworu soli (ICV-SAL, rozpuszczalnik IGF-1). Na 3 etapach (bardzo wczesny etap od 7 dnia sAD, wczesny etap od 45 dnia sAD, późny etap od 90 dnia sAD) progresji sAD ponownie zmierzono poziom pamięci przestrzennej (test MWM), zaburzeń lękowych (testy EPM, OF) i depresyjnych (test SPT). We wczesnej i późnej fazie sAD szczurom pobrano krew przez punkcję serca w celu określenia poziomu obwodowych markerów zapalenia (liczba oraz odsetek różnych populacji leukocytów - licznik hematologiczny/cytometria przepływowa; stężenie interleukiny-6 (IL-6) oraz interleukiny-10 (IL-10) - ELISA; stężenie kortykosteronu (KORT) - metoda radioimmunologiczna - RIA) jak również parametrów hematologicznych związanych z układem czerwonokrwinkowym i płytkokrwinkowym (licznik hematologiczny). Pod koniec późnej fazy sAD, po uśmierceniu zwierząt, pobrano mózg, śledzionę oraz grasnicę. W różnych regionach OUN za pomocą metody immunohistochemicznej (IHC) oznaczono liczbę aktywowanych komórek mikrogleju (CD68<sup>+</sup>) a także liczbę złogów βA. Śledzionę oraz grasnicę zważono w celu wyznaczenia wskaźników masy.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że u zwierząt z modelem sAD szczury o charakterystyce behawioralnej HR rozwinęły silniejsze zaburzenia przestrzennej pamięci referencyjnej (48-50, 92, 94-95 dzień sAD) zmierzone w teście MWM oraz silniejsze zaburzenia lękowe (45-46, 90 dzień sAD) określone na podstawie pomiarów w labiryncie EPM oraz w teście OF w porównaniu ze szczurami LR. Natomiast różnice w poziomie anhedonii pomiędzy osobnikami HR i LR z modelem sAD zmierzone w teście SPT nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej na żadnym z badanych etapów choroby. Óśrodkowe podanie IGF-1 u szczurów z modelem sAD zredukowało deficyty referencyjnej i roboczej pamięci przestrzennej (7-14, 45, 48-52, 90, 94-97 dzień sAD), zaburzenia lękowe (15, 53, 98 dzień sAD) oraz depresyjne (52, 97 dzień sAD). Co więcej, iniekcje ICV-IGF-1 u zwierząt z modelem sAD o charakterystyce behawioralnej HR zredukowały silniej zaburzenia pamięci przestrzennej w porównaniu ze szczurami LR (test MWM, 16-19, 54-55, 103-106 dzień sAD). U osobników

LR podanie tej neurotrofiny silniej wpłynęło na redukcję zaburzeń lękowych (test EPM, 53 i 98 dzień sAD) i depresyjnych (test SPT, 14 i 52 dzień sAD) w porównaniu ze szczurami HR.

Deficytom pamięci oraz zaburzeniom lękowym u osobników z grupy STZ HR towarzyszyła (99 dzień sAD) wyższa liczba oligomerów  $\beta$ A w hipokampie (regiony: CA1-CA3, DG) oraz w części brzeżnej jądra półleżącego (NAcS) w porównaniu z grupą STZ LR. Z kolei podanie ICV-IGF-1 w grupie szczurów STZ IGF-1 skutkowało niższą liczbą złogów  $\beta$ A w regionie CA1 hipokampa, niższą liczbą aktywowanych komórek mikrogleju w części CA2 hipokampa (98 dzień sAD) w porównaniu ze zwierzętami STZ SAL. Poprawa pamięci przestrzennej u osobników STZ IGF-1 HR była związana z redukcją liczby aktywowanych komórek mikrogleju (dzień 107 sAD) w regionach CA2, CA3 i DG hipokampa, a także z obniżeniem liczby oligomerów  $\beta$ A (dzień 107 sAD) w obszarach CA3 i DG hipokampa w porównaniu ze szczurami z grupy STZ IGF-1 LR. Natomiast redukcja zaburzeń neuropsychiatrycznych u zwierząt STZ IGF-1 LR powiązana była z obniżeniem liczby (dzień 107 sAD) złogów  $\beta$ A w NAcS.

Ponadto zauważyliśmy, że w modelu sAD u zwierząt STZ HR dochodzi do silniejszej supresji obwodowego układu odpornościowego, przejawiającą się jako niższa liczba komórek NK, monocytów i granulocytów we krwi w porównaniu ze zwierzętami STZ LR (54 dzień sAD). Podanie dokomorowe neurotrofiny IGF-1 szczurom z modelem sAD spowodowało redukcję obwodowego zapalenia (99 dzień sAD) tj. niższa bezwzględna liczba leukocytów, limfocytów (w tym limfocyty T, Th), monocytów, granulocytów, niższe stężenie interleukiny-6 (IL-6) w osoczu w zestawieniu ze szczurami STZ SAL. Ponadto iniekcje dokomorowe IGF-1 u osobników STZ IGF-1 spowodowały obniżenie w osoczu stężenia obwodowego wskaźnika reakcji stresowej - kortykosteronu (99 dzień sAD) w porównaniu do grupy STZ SAL. Analizując wpływ różnic osobniczych we wrażliwości na stres (HR vs. LR) zauważyliśmy, że iniekcje ICV-IGF-1 u szczurów STZ IGF-1 LR silniej redukują obwodowy stan zapalny (niższa bezwzględna liczba leukocytów i limfocytów, niższe stężenie IL-6 w osoczu) w stosunku do grupy STZ IGF-1 HR.

Podsumowując: (1) W streptozotocynowym modelu sAD u szczurów wysokoaktywnych ruchowo (HR) i o większej wrażliwości na stres dochodzi do silniejszych deficytów pamięci oraz zaburzeń lękowych, w porównaniu z osobnikami niskoaktywnymi ruchowo (LR). Zmiany te u osobników HR są związane ze zwiększonym odkładaniem złogów  $\beta$ A w hipokampie i NAcS w porównaniu ze szczurami LR; (2) indukcja sAD u szczurów, połączona z jednoczesną dokomorową iniekcją IGF-1 zmniejsza deficyty pamięci przestrzennej oraz zaburzenia depresyjne/lękowe, towarzyszące progresji sAD. Ten pozytywny efekt

neurotrofyny IGF-1 powiązany jest z redukcją liczby złogów  $\beta$ A w obszarze CA1 hipokampa, niższym poziomem neurozapalenia, mierzonego liczbą komórek CD68<sup>+</sup> w rejonie CA2 hipokampa oraz z obwodowym efektem przeciwzapalnym; (3) ośrodkowe podanie IGF-1 szczurom z modelem sAD i zróżnicowanym pod względem wrażliwości na stres (HR vs. LR) zmniejsza deficyty pamięci oraz zaburzenia lękowe/depresyjne w sposób zależny od charakterystyki behawioralnej osobnika. U zwierząt HR obserwuje się silniejsze zmniejszenie deficytów pamięci przestrzennej, powiązane z redukcją liczby złogów  $\beta$ A oraz liczby komórek CD68<sup>+</sup> w hipokampie. Natomiast u osobników LR z modelem sAD iniekcje ICV-IGF-1 wywierają silniejszy efekt antydepresyjny i anksjolityczny, w porównaniu ze szczurami z wysoką aktywnością behawioralną i większą wrażliwością na stres (HR). Przywrócenie zaburzonej sygnalizacji insulinowej we wczesnym stadium sporadycznej postaci choroby Alzheimera, poprzez ośrodkowe podanie neurotrofyny IGF-1, stanowić może nowe podejście w leczeniu tej choroby i związanych z nią zaburzeń neuropsychiatrycznych. Należy jednak pamiętać, że efekt terapeutyczny IGF-1 zależy od osobniczych różnic w reaktywności behawioralnej i stresowej.