Streszczenie pracy doktorskiej lek. Kamila Skowrona

Promotor: dr hab. Krzysztof Gil, prof. UJ

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Kurnik-Łucka

Temat pracy doktorskiej: ***„Analysis of the effects of a novel neuropeptide – kisspeptin – on peripheral and central mechanisms of metabolic dysfunction in an animal model of activity-based anorexia" („Analiza wpływu nowo odkrytego neuropeptydu – kisspeptyny – na obwodowe i centralne mechanizmy zaburzeń metabolicznych w zwierzęcym modelu anoreksji indukowanej wysiłkiem fizycznym")*** – cykl publikacji

Jadłowstręt psychiczny (gr. anorexia nervosa, AN), jako jedna z najbardziej śmiertelnych chorób psychicznych, jest mozaiką wielu czynników etiopatogenetycznych tradycyjnie postrzeganą przez pryzmat konsekwencji pierwotnie wynikających z zaburzeń natury psychologicznej. Nowoczesny model wyjaśniający powstawanie i rozwój AN ewoluował do formy przynajmniej częściowo bazującej na cechach metabolicznych. W toku analizy neurobiologicznej dostrzeżona została wyraźna dysfunkcja w przebiegu szlaków adaptacyjnych, które indukują lub przynajmniej potęgują wieloukładowe objawy kliniczne. Najistotniejsze nurty badawcze w patofizjologii anoreksji psychicznej koncentrują się na zaburzonych mechanizmach obwodowych, które nieskutecznie stymulują ośrodki mózgowe związane z regulacją procesów odżywiania. Metaboliczne hipotezy rozwoju AN znajdują także oparcie w coraz liczniejszych doniesieniach o identyfikacji specyficznych polimorfizmów genetycznych. Z tej perspektywy niezwykle ważne wydaje się być wyjaśnienie nieprawidłowości w przebiegu centralnych ścieżek patofizjologicznych u chorych z AN.

Głównym celem pracy było pogłębienie wiedzy na temat neurobiologicznych podstaw AN poprzez ocenę wpływu egzogennej kisspeptyny na rozwój i przebieg zaburzeń obserwowanych w zwierzęcym modelu anoreksji indukowanej wysiłkiem fizycznym (ang. activity-based anorexia, ABA). Dla wyjaśnienia tych procesów istotne było określenie zasadniczych zmian metabolicznych wynikających z ekspozycji na ABA w mózgowych ośrodkach odpowiedzialnych za równowagę energetyczną ustroju. Ponadto podjęto próbę szczegółowego scharakteryzowania patomechanizmów wieloukładowych zaburzeń obwodowych wywołanych przez wdrożenie modelu ABA, aby mogły one w przyszłości posłużyć jako wskaźnik odniesienia do wyników uzyskiwanych w badaniach u ludzi oraz do poszukiwań potencjalnych nowych interwencji terapeutycznych w AN.

Do badań został zaadaptowany szczurzy model anoreksji indukowanej wysiłkiem fizycznym. W zakresie tego modelu dokonano analizy obwodowych i centralnych zaburzeń neurohormonalnych. Oprócz obserwacji zachowania zwierząt, ich aktywności fizycznej, zmian masy ciała i ilości spożywanego pokarmu badano zmienność rytmu serca i ciśnienia tętniczego krwi. Pobrane tkanki opracowano i poddano analizie biochemicznej oraz histopatologicznej. Ponadto metodą spektroskopii rezonansu magnetycznego stworzono profil neurochemiczny rejonu podwzgórza i pnia mózgu.

Otrzymane spektra metabolitów mózgowych ukazały zachwianą równowagę odzwierciedlającą wpływ ABA na lokalny bilans energetyczny i adaptacyjne mechanizmy antyoksydacyjne. Wykazano również

szereg zaburzeń obejmujących ogólnoustrojową gospodarkę metaboliczną, funkcje rozrodcze oraz układ sercowo-naczyniowy, które w znacznym stopniu odzwierciedlają obraz kliniczny AN.

Do dalszej części badania wyselekcjonowano podwzgórzowy neuropeptyd – kisspeptynę (ang. kisspeptin, Kp), który fizjologicznie stymuluje wydzielanie gonadoliberyny (GnRH), będąc jednocześnie w dwukierunkowej integracji z homeostazą energetyczną organizmu. Kisspeptyna podana podskórnie złagodziła przebieg modelowania ABA poprzez zmianę wzorca utraty masy ciała. Ponadto w ośrodkach mózgowych odpowiedzialnych za regulację odżywiania udało się dokonać częściowej normalizacji stężenia kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) i kreatyny (podwzgórze), jak i przywrócenia bazowego poziomu glutaminianu (pień mózgu). Otrzymane wyniki wskazują, że kisspeptyna potencjalnie poprzez modulację podwzgórzowej sygnalizacji GABA-ergicznej zwiększa możliwości przyjmowania pokarmu, a tym samym pozytywnie wpływa na metabolizm mózgu.

Wszystkie dotychczas opublikowane próby wyjaśnienia powstania i rozwoju anoreksji wskazują na jej wieloczynnikowy charakter z ogromną liczbą złożonych zależności. Zaprezentowany w niniejszej pracy doktorskiej cykl publikacji skupia się na jednym wybranym aspekcie – neurobiologicznym podłożu AN.

Uzyskane wyniki badań pozwalają na sformułowanie trzech głównych wniosków:
1. Kisspeptyna podawana podskórnie wykazuje potencjał terapeutyczny w przedklinicznym modelu anoreksji, poprawiając dobrostan zwierząt poprzez zmianę wzorca utraty masy ciała. 2. Modelowanie ABA oprócz zaburzeń obwodowych skutkuje charakterystycznymi zmianami neurochemicznymi w centralnych ośrodkach odpowiedzialnych za równowagę metaboliczną organizmu, które mogą zostać częściowo cofnięte przez podanie egzogennej kisspeptyny.
3. Szczurzy model anoreksji indukowanej wysiłkiem fizycznym w zakresie zaburzeń metabolicznych i endokrynologicznych istotnie odzwierciedla obraz kliniczny pacjentów chorujących na jadłowstręt psychiczny, stanowiąc tym samym optymalne narzędzie w badaniach translacyjnych.

Zastosowanie nowo odkrytych neuropeptydów, takich jak kisspeptyna, w leczeniu AN budzi nadzieję. Kontynuujemy te badania w modyfikacji modelu ABA ze stopniowym, ilościowym ograniczaniem dostępu do pożywienia. Pozwoli to na jeszcze dokładniejsze odzwierciedlenie długoterminowych zmian neurobiologicznych, podobnych do tych zachodzących u ludzi z AN, co potencjalnie umożliwi identyfikację istotnych klinicznie punktów uchwytu dla nowoczesnych terapii jadłowstrętu psychicznego.

Summary

Anorexia nervosa (AN), as one of the most deadly mental illnesses, is a mosaic of multiple harmonizing etiopathogenetic factors. AN has traditionally been viewed as a disorder of a psychological nature, but the modern model explaining its origin and development has evolved to a form at least partially based on a metabolic component. Neurobiological analysis has recognized a clear dysfunction in adaptive pathways that induce or at least potentiate multisystemic clinical symptoms. The most prominent research streams in the pathophysiology of AN point to a dysfunctional peripheral response that ineffectively stimulates brain centers associated with the regulation of eating. Metabolic hypotheses on the origin of AN are also supported by molecular identification of specific genetic polymorphisms. From this perspective, the elucidation of abnormalities in central pathophysiological pathways seems to be of utmost importance.

The main aim of this study was to explore the neurobiological basis of AN by assessing the effect of exogenous kisspeptin on the development and course of abnormalities observed in an animal model of activity-based anorexia (ABA). To elucidate these processes, it was important to determine the fundamental metabolic changes resulting from exposure to ABA in the brain centers responsible for appetite and satiety regulation. In addition, an attempt was made to characterize the pathomechanisms of the multisystemic peripheral disturbances induced in the ABA model so that they could be reliably interpreted in the context of human studies and potential new therapeutic interventions in anorexia nervosa.

A rat model of activity-based anorexia was adapted for this study, in which peripheral and central neurohormonal disturbances were analyzed. Besidesthe observation of animal behavior, physical activity, changes in body weight, and food intake, the variability of heart rate and blood pressure were assessed. The collected tissues were processed and subjected to biochemical and histopathological analysis. In addition, using magnetic resonance spectroscopy, we developed a neurochemical profile of the hypothalamus and brainstem. The resulting brain metabolite spectra revealed an imbalance reflecting the effects of ABA on local energy balance and adaptive antioxidant mechanisms. A number of abnormalities involving systemic metabolism, reproductive function, and the cardiovascular system were also demonstrated, largely reflecting the clinical picture of AN.

The hypothalamic neuropeptide kisspeptin (Kp), which physiologically integrates the body's energy homeostasis with its reproductive function, was selected for further investigation. Kisspeptin administered subcutaneously alleviated ABA modeling by altering the pattern of weight loss. In addition, partial normalization of gamma-aminobutyric acid (GABA) and creatine levels (hypothalamus), as well as restoration of basal glutamate levels (brainstem), was achieved in brain centers responsible for the regulation of appetite and satiety. The results obtained indicate that

kisspeptin potentially, through modulation of hypothalamic GABA-ergic signaling, increases food intake and thus positively affects brain metabolism.

All attempts to explain the origin and development of anorexia indicate its multifactorial character with a huge number of complex interrelations. The series of publications presented in this dissertation focuses on one selected aspect – the neurobiological background of AN.

The results allow us to formulate three main conclusions:

1. Kisspeptin administered subcutaneously shows therapeutic potential in a preclinical model of anorexia, improving animal welfare by altering the pattern of weight loss.
2. ABA modeling, in addition to peripheral disturbances, causes characteristic neurochemical changes in brain regions controlling metabolic balance that can be partially reversed by the administration of exogenous kisspeptin.
3. The rat model of activity-based anorexia in terms of metabolic and endocrine abnormalities reflects the clinical picture of patients suffering from anorexia nervosa, thus providing an optimal tool in translational research.

The use of newly discovered neuropeptides such as kisspeptin in the treatment of AN is promising. We are pursuing this research in a modification of the ABA model with gradual, quantitative food restriction. This will allow for an even more accurate representation of long term neurobiological changes similar to those occurring in humans with AN, potentially identifying clinically relevant capture points for modern therapies of eating disorders