

**Mgr biol. Łukasz Przykaza**

**rozprawa doktorska**

**Potencjał neuroprotekcyny specyficznego  
agonisty receptora Y2 neuropeptydu Y w udarze  
niedokrwiennym mózgu u szczurów normotensyjnych  
i szczurów z genetycznie uwarunkowanym  
nadciśnieniem tętniczym SHR**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Ewa Koźniewska-Kołodziejaska

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Helena Domin

Mgr biol. Łukasz Przykaza

***Potencjał neuroprotekcyny specyficznego agonisty  
receptora Y2 neuropeptydu Y  
w udarze niedokrwiennym mózgu u szczurów  
normotensyjnych i szczurów z genetycznie  
uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym SHR***

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Ewa Koźniewska-Kołodziejska  
(Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk)

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Helena Domin  
(Instytut Farmakologii im. J. Maja Polskiej Akademii Nauk)



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową Instytutu  
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława  
Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022 r.



*Niniejszą pracę dedykuję moim Rodzicom*



*Serdeczne podziękowania składam mojemu promotorowi  
Pani Prof. dr hab. Ewie Koźniewskiej-Kołodziejskiej za umożliwienie mi wykonania badań  
w Pracowni Neurochirurgii Doświadczalnej IMDiK PAN oraz opiekę merytoryczną.*

*Dziękuję Pani Dr hab. Helenie Domin, mojemu promotorowi pomocniczemu, za uwagi  
i wskazówki, udzielone mi w trakcie prac nad niniejszą rozprawą.*

*Wyrazy wdzięczności składam również  
Pani Prof. dr hab. Marii Śmiałowskiej (z Instytutu Farmakologii PAN),  
Panu Dr Pawłowi Boguszewskiemu (z Instytutu Biologii Doświadczalnej im.  
M. Nenckiego PAN), Pani Dr Hannie Kozłowskiej, Pani Mgr Magdalenie Łachwa-From,  
Pani Dr Luizie Stanaszek, Pani Dr Dominice Zajac oraz wszystkim Osobom, które  
jakkolwiek przyczyniły się do powstania tej rozprawy.*



**Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:**

Domin H, **Przykaza Ł**, Jantas D, Kozniewska E, Boguszewski PM, Śmiałowska M. *Neuropeptide Y Y2 and Y5 receptors as promising targets for neuroprotection in primary neurons exposed to oxygen-glucose deprivation and in transient focal cerebral ischemia in rats*. Neuroscience. 2017; 344:305-325;

**Przykaza Ł**, Kozniewska E. *Ligands of the Neuropeptide Y Y2 Receptors as a Potential Multitarget Therapeutic Approach for the Protection of the Neurovascular Unit Against Acute Ischemia/Reperfusion: View from the Perspective of the Laboratory Bench*. Translational Stroke Research. 2022; 13(1):12-24;

**oraz przedstawione w postaci plakatu na międzynarodowej konferencji naukowej:**

**Przykaza L**, Domin H, Boguszewski PM, Śmiałowska M, E. Kozniewska E. *Attenuation of postischemic functional deficits in rats with essential hypertension treated with NPY2R agonist*. XXVIIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, June 27 – 30, 2015, Vancouver, Canada.

Badania, stanowiące podstawę rozprawy były finansowane przez IMDiK PAN (temat statutowy 1 „Naczyniowe i metaboliczne mechanizmy niedokrwienia mózgu u chorych i w modelach doświadczalnych udaru niedokrwiennego i krwotocznego”), przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu nr N N401 091037 („Badania neuroprotekcynowego działania pochodnych neuropeptydu Y, pobudzających receptory Y2 i Y5 oraz agonistów receptorów glutaminianergicznym metabotropowych grupy III, w eksperymentalnej ischemii *in vitro* i *in vivo*”; kierownik grantu: prof. dr hab. Maria Śmiałowska) oraz przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu Preludium 17, nr N/NZ4/02894 („Poszukiwanie podłoża neuroprotekcynowego działania specyficznego agonisty receptorów Y2 – NPY(13-36) w modelu przejściowego, ogniskowego niedokrwienia mózgu u szczurów”; kierownik grantu: mgr Łukasz Przykaza).





## **Spis treści**

	<b>Strona nr</b>
<b>Wykaz skrótów użytych w pracy</b> .....	<b>1</b>
<b>Streszczenie</b> .....	<b>4</b>
<b>Summary</b> .....	<b>9</b>
<b>Innowacyjność pracy</b> .....	<b>13</b>
<b>1. Wstęp</b> .....	<b>15</b>
1.1. Wprowadzenie.....	15
1.2. Mechanizmy uszkodzenia jednostki nerwowo-naczyniowej w wyniku niedokrwienia i reperfuzji mózgu.....	21
1.2.1. Procesy ekscytotoksyczności, depolaryzacji okołozawłowych i zapalenia, rola jonów wapnia.....	21
1.2.2. Hipotetyczna rola cyklicznego adenozynomonofosforanu w procesach uszkodzenia NVU w czasie ostrej fazy niedokrwienia mózgu.....	25
1.3. Podstawowe koncepcje leczenia udaru, celowanego w ochronę jednostki nerwowo-naczyniowej.....	26
1.4. Dystrybucja i funkcje receptorów Y2 w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków.....	27
1.5. Potencjał neuroprotektoryjny pobudzenia receptorów Y2.....	29
<b>2. Cel badań</b> .....	<b>32</b>
<b>3. Materiały i metody</b> .....	<b>33</b>
3.1. Zwierzęta eksperymentalne.....	33
3.2. Ogniskowe niedokrwienie mózgu z reperfuzją.....	34
3.3. Ocena wielkości uszkodzenia mózgu.....	36
3.4. Testy behawioralne.....	37
3.4.1. Ocena parametrów chodu w teście CatWalk.....	37
3.4.2. Ocena aktywności ruchowej w teście otwartego pola.....	39
3.5. Ocena zaburzeń regulacji mikrokrążenia krwi w strefie półcienia ischemicznego.....	39
3.6. Pobranie tkanek mózgu do badań immunofluorescencyjnych.....	41
3.6.1. Ocena gęstości i szczelności naczyń mikrokrążenia.....	41
3.7. Punkty czasowe, w których przeprowadzono badania wpływu podania NPY(13-36).....	43
3.8. Analiza statystyczna danych.....	43
3.8.1. Analiza zmian mikroprzepływu w korze mózgowej w czasie niedokrwienia i reperfuzji mózgu oraz analiza wielkości poischemicznego uszkodzenia mózgu.....	43

3.8.2. Analiza wyników badań behawioralnych.....	44
3.8.3. Analiza wyników oceny zaburzeń regulacji mikrokrążenia krwi i stopnia rekrutacji krążenia obocznego do strefy półcienia w czasie niedokrwienia.....	44
3.8.4. Analiza wyników oceny gęstości i szczelności naczyń mikrokrążenia.....	45
<b>4. Wyniki.....</b>	<b>46</b>
4.1. Analiza zmian masy ciała szczurów w kolejnych dobach po reperfuzji mózgu.....	46
4.2. Charakterystyka hemodynamiczna ogniska niedokrwienia i strefy półcienia w czasie niedokrwienia i reperfuzji u szczurów szczepu SD i SHR, wpływ NPY(13-36).....	47
4.2.1. Zmiany LDF podczas ogniskowego niedokrwienia i reperfuzji mózgu u szczurów szczepu SD.....	47
4.2.2. Zmiany LDF podczas ogniskowego niedokrwienia i reperfuzji mózgu u szczurów szczepu SHR.....	49
4.3. Wpływ NPY(13-36) na wielkość obszaru mózgu uszkodzonego niedokrwieniem u szczurów szczepu SD i SHR.....	50
4.3.1. Analiza porównawcza wpływu NPY(13-36) na poniedokrwienne uszkodzenie mózgu u szczurów szczepu SD i szczurów szczepu SHR.....	52
4.4. Analiza sprawności chodu i sponatnicznej aktywności ruchowej 72 godziny po reperfuzji mózgu, wpływ NPY(13-36).....	53
4.4.1. Zmiany parametrów chodu u szczurów szczepu SD w teście CatWalk.....	53
4.4.2. Zmiany parametrów chodu u szczurów szczepu SHR w teście CatWalk.....	57
4.4.3. Analiza korelacji pomiędzy zmianami parametrów chodu i wielkością uszkodzenia mózgu, u szczurów szczepu SD i SHR.....	61
4.4.4. Zmiany aktywności ruchowej u szczurów szczepu SD i SHR w teście otwartego pola.....	63
4.5. Zaburzenia regulacji mikrokrążenia w strefie półcienia ischemicznego u szczurów szczepu SD 24 godziny po reperfuzji mózgu, wpływ NPY(13-36).....	65
4.6. Zaburzenia regulacji mikrokrążenia w strefie półcienia ischemicznego u szczurów szczepu SHR 24 godziny po reperfuzji mózgu, wpływ NPY(13-36).....	67
4.7. Wpływ NPY(13-36) na gęstość naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej u szczurów szczepu SD i SHR 72 godziny po reperfuzji mózgu.....	69
4.7.1. Wpływ NPY(13-36) na gęstość naczyń mikrokrążenia u szczurów szczepu SD.....	69
4.7.2. Wpływ NPY(13-36) na gęstość naczyń mikrokrążenia u szczurów szczepu SHR.....	70
4.7.3. Różnice gęstości naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej pomiędzy szczepami SD i SHR.....	71

4.8. Wpływ NPY(13-36) na szczelność naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej 72 godziny po reperfuzji mózgu u szczurów szczepu SD i SHR.....	72
4.8.1. Ocena szczelności naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej szczurów SHAM SD i SHAM SHR.....	73
<b>5. Dyskusja wyników .....</b>	<b>74</b>
5.1. Uzasadnienie wyboru modelu eksperymentalnego.....	74
5.2. Wpływ NPY(13-36) na wielkość poniedokrwiennego uszkodzenia mózgu.....	75
5.3. Wpływ NPY(13-36) na poniedokrwiennie zaburzenia chodu i spontanicznej aktywności ruchowej.....	79
5.4. Wpływ NPY(13-36) na zaburzenia regulacji mikrokrążenia krwi w korze mózgowej w strefie półcienia ischemicznego.....	83
5.5. Wpływ NPY(13-36) na zmniejszenie gęstości naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej 72 godziny po reperfuzji mózgu.....	86
5.6. Wpływ NPY(13-36) na szczelność naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej 72 godziny po reperfuzji mózgu .....	88
<b>6. Podsumowanie wyników.....</b>	<b>90</b>
<b>7. Wnioski.....</b>	<b>91</b>
<b>8. Piśmiennictwo.....</b>	<b>92</b>



## Wykaz skrótów użytych w pracy

AC	cyklaza adenylanowa (ang. <i>Adenylate cyclase</i> )
ACA	tętnica przednia mózgu (ang. <i>Anterior cerebral artery</i> )
AMP	adenozynomonofosforan
AMPA	kwasy α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
ANOVA	analiza wariancji (ang. <i>Analysis of variance</i> )
AP-1	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>Activator protein 1</i> )
AQP4	akwaporyna 4 (ang. <i>Aquaporin 4</i> )
ATP	adenozynotryfosforan
BBB	bariera krew-mózg (ang. <i>Blood-brain barrier</i> )
BDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
Bcl-2	białka przeciwapoptotyczne Bcl-2 (ang. <i>B cell lymphoma 2 protein</i> )
Bcl-xL	białko przeciwapoptotyczne Bcl-xL (ang. <i>B-cell lymphoma-extra large protein</i> )
BSA	albumina surowicy bydłej (ang. <i>Bovine serum albumine</i> )
cAMP	cykliczny adenzynomonofosforan
CBF	przepływ krwi przez mózg (ang. <i>Cerebral blood flow</i> )
CI	indeks chemiczny (ang. <i>Chemical vasomotor reactivity index</i> )
CSD	rozszerzająca się depresja korowa (ang. <i>Cortical spreading depression</i> )
COX-2	cyklooksygenaza 2 (ang. <i>Cyclooxygenase 2</i> )
CVR	opór naczyniowy w krążeniu mózgowym (ang. <i>Cerebrovascular resistance</i> )
CVRI	wskaźnik oporu naczyniowego w krążeniu mózgowym (ang. <i>Cerebrovascular resistance index</i> )
DAMPs	alarminy, struktury molekularne związane z uszkodzeniem (ang. <i>Danger/damage associated molecular patterns</i> )
ER	siateczka śródplazmatyczna (ang. <i>Endoplasmic reticulum</i> )
EPO	erytropoetyna
bFGF	podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>Basic fibroblast growth factor</i> )
GABA	kwasy γ-aminomasłowy (ang. <i>Gamma-aminobutyric acid</i> )
GLT-1	transporter kwasu glutamininowego (ang. <i>Glutamate transporter-1</i> )

GLAST	transporter kwasu glutamininowego (ang. <i>Glutamate/aspartate transporter</i> )
HMGB1	białko należące do grupy alarmin (ang. <i>High mobility group box 1</i> )
HSP 60	białko szoku cieplnego (ang. <i>Heat shock protein 60</i> )
IgG	immunoglobulina G
IL	interleukiny
K <sub>ATP</sub>	kanał potasowy zależny od ATP
KCl	chlerek potasu
Kir	kanał potasowy wewnątrzprostowniczy (ang. <i>Inward-rectifier potassium channel</i> )
LDF	mikroprzepływ w korze mózgowej (ang. <i>Laser-Doppler flow</i> )
LMA	połączenia tętniczo-tętnicze w obrębie naczyń opony miękkiej mózgu (ang. <i>Leptomeningeal anastomoses</i> )
L-NAME	ester metylowy L-nitroargininy (ang. <i>L-arginine methyl ester</i> )
LP, PP	lewa łapa przednia, prawa łapa przednia
LT, PT	lewa łapa tylna, prawa łapa tylna
MANOVA	wielowymiarowa analiza wariancji (ang. <i>Multivariate analysis of variance</i> )
MAPK	kinaza aktywowana mitogenami (ang. <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
mGluR	metabotropowe receptory glutaminianu
MABP	średnie ciśnienie tętnicze krwi (ang. <i>Mean arterial blood pressure</i> )
MCA	tętnica środkowa mózgu (ang. <i>Middle cerebral artery</i> )
MCAO	zamknięcie światła tętnicy środkowej mózgu (ang. <i>Middle cerebral artery occlusion</i> )
MCAOR	zamknięcie światła tętnicy środkowej mózgu z reperfuzją (ang. <i>Middle cerebral artery occlusion with reperfusion</i> )
MLI	wskaźnik szczelności mikronaczyń (ang. <i>Microvessel leakage index</i> )
MMP	metaloproteinazy
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. <i>Messenger ribonucleic acid</i> )
NaCl	chlerek sodu
NFκB	jądrowy czynnik transkrypcyjny (ang. <i>Nuclear factor kappa beta</i> )
NO	tlenek azotu (ang. <i>Nitric oxide</i> )
N <sub>2</sub> O	podtlenek azotu
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

NMDA	kwask N-metylo-D-asparaginowy (ang. <i>N-methyl-D-aspartic acid</i> )
NPY	neuropeptyd Y (ang. <i>Neuropeptide Y</i> )
NPY(13-36)	C-końcowy fragment cząsteczki neuropeptydu Y
NVC	sprężenie nerwowo-naczyniowe (ang. <i>Neurovascular coupling</i> )
NVU	jednostka nerwowo-naczyniowa (ang. <i>Neurovascular unit</i> )
O <sup>2-</sup>	anion ponadtlenkowy
OFR	wolne rodniki tlenowe (ang. <i>Free oxygen radicals</i> )
OGD	deprywacja tlenu i glukozy (ang. <i>Oxygen-glucose deprivation</i> )
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	roztwór soli buforowany fosforanami (ang. <i>Phosphate buffered saline</i> )
pCO <sub>2</sub>	ciśnienie cząsteczkowe CO <sub>2</sub> we krwi tętniczej
PCA	tętnica tylna mózgu (ang. <i>Posterior cerebral artery</i> )
PFA	aldehyd kwasu mrówkowego
PID	depolaryzacja okołozawałowa (ang. <i>Periinfarct depolarization</i> )
PKA	kinaza białkowa A
P2X7	klasa receptorów purynergicznyc (ang. <i>Purinergic receptor P2X 7</i> )
rtPA	rekombinowany aktywator plazminogenu
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>Reactive oxygen species</i> )
SD	szczep szczurów <i>Sprague-Dawley</i>
SHAM	operacja pozorowana
SHR	szczep szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (ang. <i>Spontaneously Hypertensive Rats</i> )
TLR	receptor toll-podobny (ang. <i>Toll-like receptor</i> )
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>Tumor necrosis factor</i> )
TTC	chlorek 2,3,5-trifenylotetrazoliowy (ang. <i>2,3,5-triphenyltetrazolium chloride</i> )
XO	oksydaza ksantynowa (ang. <i>Xanthine oxidase</i> )
Y2R	receptory typu 2 dla neuropeptydu Y
VEGF	śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i> )



## Streszczenie

Udar niedokrwienny mózgu jest jednym z głównych problemów zdrowotnych i społeczno-ekonomicznych starzejących się populacji krajów uprzemysłowionych. Najczęściej występującym rodzajem udaru niedokrwiennego mózgu jest udar ogniskowy (85% wszystkich przypadków). Stanowi on trzecią, co do częstości, przyczynę zgonów na świecie. Powyżej 50% osób, które przeżyły ostrą fazę udaru pozostaje niepełnosprawnymi, napotykając trudności w wykonywaniu codziennych czynności.

Mimo wielu lat badań i pozytywnych wyników w zakresie neuroprotekcji, uzyskanych w doświadczeniach na zwierzęcych modelach udaru mózgu, próby przeniesienia tych potencjalnych terapii do leczenia pacjentów po udarze niedokrwiennym nie powiodły się.

Analiza przyczyn niskiego potencjału translacyjnego wyników badań doświadczalnych nad neuroprotekcją w udarze mózgu doprowadziła do wniosku, że badacze nie uwzględniali w dostatecznym stopniu złożoności patofizjologii niedokrwiennej u ludzi i towarzyszących jej chorób.

Badania podstawowe zaowocowały jednak obserwacjami, które umożliwiły lepsze zrozumienie zjawisk zachodzących podczas ostrego niedokrwienia mózgu i zostały potwierdzone także w udarze mózgu u ludzi. Wykazano, że w czasie pierwszych sekund/minut ogniskowego niedokrwienia mózgu obszar niedokrwienny różnicuje się czasowo-przestrzennie na ognisko niedokrwienia (ang. *Infarct core* lub *ischemic core*) i otaczającą je strefę półcienia/penumbry (ang. *Periinfarct penumbra* lub *ischemic penumbra*). W ognisku niedokrwienia w ciągu kilku/kilkunastu minut po udarze następuje nieodwracalne uszkodzenie komórek. Natomiast w strefie półcienia dochodzi do zaburzenia funkcji, a nieodwracalna śmierć komórek następuje znacznie wolniej. Występuje więc okno terapeutyczne – czas w którym zastosowanie odpowiedniej terapii może uratować strefę półcienia, a tym samym zmniejszyć skutki udaru.

Ponadto, zwrócono uwagę na endogenne procesy ochronne i naprawcze w udarze mózgu. Jedną z klas substancji endogennych o potencjalnych właściwościach ochronnych są neuropeptydy, które w warunkach fizjologicznych pełnią rolę kotransmiterów lub neuromodulatorów, a także są aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenie mózgu oraz w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Jednym z nich jest neuropeptyd Y (NPY). W wielu badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że aktywacja receptorów Y2 (Y2R) tego neuropeptydu zmniejsza uwalnianie neuroprzekazników pobudzających – głównych

mediatorów eksytotoksyczności, prowadzącej do śmierci komórek mózgu po niedokrwieniu i w chorobach neurodegeneracyjnych.

Celem badań stanowiących podstawę niniejszej rozprawy była próba wyjaśnienia podłoża neuroprotekcijnego działania specyficznego agonisty receptora Y2 – C-końcowego fragmentu cząsteczki neuropeptydu Y – NPY(13-36) *in vivo*, w modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu z reperfuzją (ang. *Middle cerebral artery occlusion with reperfusion*, MCAOR), u szczurów normotensyjnych *Sprague-Dawley* (SD) i szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR, ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*). Cele szczegółowe badań obejmowały określenie wpływu NPY(13-36), podanego do komory bocznej mózgu 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji na: i) wielkość obszaru mózgu uszkodzonego w wyniku niedokrwienia/reperfuzji; ii) wybrane parametry chodu i spontaniczną aktywność ruchową; iii) odpowiedź mikroprzepływu krwi w strefie półcienia ischemicznego na wzrost ciśnienia parcjalnego CO<sub>2</sub> we krwi tętniczej i na podanie inhibitora syntazy tlenu azotu; iv) gęstość naczyń mikrokrążenia w strefie półcienia; v) szczelność bariery krew-mózg w naczyniach włosowatych w strefie półcienia ischemicznego.

Badania przeprowadzono na 3-miesięcznych samcach szczurów SD (n = 67) i SHR (n = 62). Pula szczurów w każdym ze szczepów została losowo przydzielona do jednej z 4 grup: grupy SHAM (niedokrwienie pozorowane); grupy kontrolnej (niedokrwienie i podanie do prawej komory bocznej mózgu 6 µl 0,9% NaCl); grupy z NPY(13-36) podanym 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia; grupy z NPY(13-36) podanym 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji. NPY(13-36) był podawany do komory bocznej mózgu w dawce 10 µg (6 µl roztworu w 0,9% NaCl).

Zamknięcie prawej tętnicy środkowej mózgu (90 minut) i reperfuzję przeprowadzono w narkozie wziewnej (70%N<sub>2</sub>O/30%O<sub>2</sub>/2-2,5% izofluranu). Stopień niedokrwienia był monitorowany za pomocą pomiaru mikroprzepływu krwi w korze mózgowej (LDF, ang. *Laser-Doppler flow*) w ognisku niedokrwienia lub w ognisku i w strefie półcienia ischemicznego. W trzeciej dobie po reperfuzji przeprowadzano testy behawioralne, obejmujące ocenę chodu po bieżni poziomej (test CatWalk 7.1) i spontaniczną aktywność ruchową (test otwartego pola). Wykonanie tych testów po niedokrwieniu lub niedokrwieniu i podaniu NPY(13-36) porównywano z ich wykonaniem przed niedokrwieniem (w przeddzień niedokrwienia wykonywano rejestrację kontrolną). Po 72 godzinach po reperfuzji oceniano też wielkość uszkodzenia mózgu za pomocą barwienia chlorkiem

2,3,5-trifenylo-tetrazoliowym (TTC). Dokonano porównań międzygrupowych pod względem wielkości tego uszkodzenia w ramach szczepów, a także porównania pomiędzy szczepami za pomocą metody metaanalizy. Po upływie 72 godzin po reperfuzji, część zwierząt z każdej grupy i szczepu była perfundowana 4% roztworem paraformaldehydu, ich mózgi pobierane i przygotowywane do oceny w mikroskopie konfokalnym. Przeprowadzono barwienia immunofluorescencyjne przy użyciu przeciwciał dla markera endotelium RECA-1 (badanie gęstości najmniejszych naczyń krwionośnych), oraz immunoglobulin IgG szczerzego osocza (ocena stopnia przeciekania naczyń – detekcja miejsc wynaczynienia IgG). Ocenie poddano naczynia mikrokrążenia w korze mózgowej w obszarze penumbry. W następnej serii doświadczalnej, 24 godziny po reperfuzji oceniano odpowiedzi mikrokrążenia w obszarze penumbry na hiperkapnię (regulacja chemiczna) oraz zablokowanie syntezy tlenu azotu (regulacja podstawowego napięcia naczyń zależna od tlenu azotu). W tych doświadczeniach prowadzono stały pomiar ciśnienia tętniczego krwi metodą bezpośrednią. Do badania regulacji chemicznej zastosowano bodziec w postaci 5% CO<sub>2</sub> dodawanego do mieszaniny gazów oddechowych. W tym samym doświadczeniu, po teście na hiperkapnię i 30 minutach stabilizacji LDF w normokapnii, przeprowadzono test funkcji śródbłonna poprzez ocenę odpowiedzi LDF na dożylnie podanie metylowanej pochodnej L-argininy – L-NAME w dawce 30 mg/kg.

Analizy statystyczne, za wyjątkiem metaanaliz, przeprowadzono z użyciem programu Statistica 8 (StatSoft); stosowano statystyki opisowe, testy t-Studenta oraz analizę wariancji (ANOVA i MANOVA). Metaanalizę przeprowadzono w programie Review Manager 5.3.

Uzyskano następujące wyniki:

1 – spadek LDF w regionie ogniska niedokrwienia (około 80% wartości wyjściowej) podczas 90 minut zamknięcia światła tętnicy środkowej mózgu i jego powrót w czasie reperfuzji były porównywalne w grupie kontrolnej i u szczurów, którym podano NPY(13-36) 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia lub reperfuzji, zarówno u szczurów szczepu SD jak i SHR; 2 – spadek LDF w regionie penumbry wynosił około 30% wartości wyjściowej w grupie kontrolnej szczurów szczepu SD i SHR i utrzymywał się na tym poziomie przez 90 minut niedokrwienia; 3 – podanie NPY(13-36) w trakcie niedokrwienia zmniejszyło statystycznie istotnie spadek LDF w penumbrze (wzrost o 14%) u szczurów SD, co wskazuje na rekrutację naczyń mikrokrążenia; u szczurów szczepu SHR podanie NPY(13-36) nie wywarło wpływu na poziom LDF w penumbrze; 4 – wielkość uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu była istotnie większa w grupie kontrolnej szczurów szczepu SHR (uszkodzenie  $40,48 \pm 1,41\%$  ipsilateralnej półkuli mózgu) w porównaniu z uszkodzeniem w grupie kontrolnej szczurów

szczepu SD (uszkodzenie  $34,4 \pm 1,4\%$  ipsilateralnej półkuli mózgu); u obu szczepów szczurów NPY(13-36) statystycznie istotnie zmniejszył obszar uszkodzenia mózgu w każdym z wariantów podania; 5 – w badaniach behawioralnych wykonanych 72 godziny po reperfuzji mózgu, w grupach kontrolnych szczurów SD i SHR zaobserwowano podobne upośledzenie chodu wyrażone przede wszystkim zmniejszeniem średniej prędkości, wydłużeniem czasu cyklu kroku i wyraźnym skróceniem długości kroku w porównaniu do wielkości tych parametrów sprzed niedokrwienia; w obu grupach z NPY(13-36) parametry chodu uległy poprawie, przy czym peptyd podany w czasie niedokrwienia był bardziej skuteczny; zmiany obserwowane po niedokrwieniu w teście otwartego pola były również podobne w grupach kontrolnych szczurów SD i SHR, odnotowano wyraźny spadek mobilności zwierząt manifestujący się skróceniem czasu spędzonego na przemieszczaniu się i całkowitej drogi przebytej w okresie 10 minut obserwacji, co przekładało się na zmniejszenie prędkości chodu; w obu grupach szczurów szczepów SD i SHR, którym podano NPY(13-36) nie zaobserwowano poprawy ruchliwości spontanicznej w tym teście; 6 – odpowiedź LDF na hiperkapnię, w korze mózgowej w obszarze półcienia nie zmieniła się istotnie u szczurów szczepu SD 24 godziny po reperfuzji w porównaniu do odpowiedzi w grupie z niedokrwieniem pozorowanym. U szczurów szczepu SHR odpowiedź LDF na hiperkapnię w grupie kontrolnej uległa istotnemu pogorszeniu, a podanie NPY(13-36) nie poprawiło tej odpowiedzi; ponadto, w grupach kontrolnych szczurów szczepów SD i SHR zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie odpowiedzi na podanie L-NAME w porównaniu z odpowiedzią u szczurów w grupach z niedokrwieniem pozorowanym; NPY(13-36) przywrócił tę odpowiedź jedynie u szczurów SHR i tylko wtedy, kiedy był poddany w fazie reperfuzji; 7 – w badaniach immunofluorescencyjnych z użyciem przeciwciała anti-RECA-1 wykazano, że gęstość najmniejszych naczyń krwionośnych kory mózgowej w warunkach podstawowych jest mniejsza u szczurów SHR niż u SD; 72 godziny po reperfuzji gęstość mikronaczyń w korze mózgowej w obszarze penumbry zmniejszyła się statystycznie istotnie zarówno u szczurów szczepu SD jak i SHR; NPY(13-36) przywracał ją, niezależnie od momentu podania; 8 – analiza stopnia przeciekania mikronaczyń wykazała, że szczury z nadciśnieniem tętniczym w warunkach podstawowych mają ok. 3 razy więcej naczyń przeciekających niż szczury normotensyjne; po niedokrwieniu odnotowano zwiększenie liczby naczyń przeciekających u obu szczepów szczurów, jednak podanie NPY(13-36) nie zmniejszyło liczebności miejsc przeciekania.

Podsumowując, NPY(13-36) wywiera korzystne działanie ochronne na niedokrwiony mózg na poziomie mikrokrążenia, zarówno u szczurów zdrowych jak i obciążonych

nadciśnieniem tętniczym. Działanie to obejmuje: i) zwiększenie mikroprzepływu w korze mózgowej w strefie penumbry w czasie niedokrwienia u szczurów SD, sugerujące rekrutację krążenia obocznego; ii) zmniejszenie obszaru poniedokrwiennej martwicy mózgu, poprawę parametrów chodu oraz zwiększenie gęstości najmniejszych naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej w obszarze penumbry u szczurów SD i SHR 72 godziny po reperfuzji mózgu (skuteczność przy podaniu zarówno w fazie niedokrwienia jak i reperfuzji); iii) poprawę reaktywności mikroprzepływu w obszarze penumbry na zablokowanie syntazy tlenu azotu u szczurów SHR (skuteczność przy podaniu w fazie reperfuzji).

## Summary

Ischemic stroke is one of the major health and socio-economic problems of the aging population of industrialized countries. The most common type of ischemic stroke (85% of all cases) is focal stroke, which is the third most common cause of death worldwide. More than 50% of those who survive the acute phase of stroke remain disabled, encountering difficulties in carrying out daily activities.

Despite many years of neuroprotection research and positive results obtained in animal models of stroke, attempts to transfer these potential therapies to the treatment of ischemic stroke patients have failed.

The analysis of the causes of the low translational potential of the results of experimental studies on neuroprotection in stroke led to the conclusion that the researchers have not sufficiently considered the complexity of the ischemic pathophysiology of human stroke and its associated diseases. However, basic research resulted in some observations that provided a better understanding of the phenomena occurring during acute cerebral ischemia, which were confirmed in human stroke. It has been shown that during the first seconds/minutes of focal cerebral ischemia, the ischemic area differentiates temporally and spatially into the infarct core and the surrounding ischemic penumbra. As a result, irreversible cell damage occurs in the ischemic core within a few minutes after the beginning of the stroke cascade. On the other hand, in the penumbra, cells function is impaired, and irreversible cell death occurs much slower. So there is a therapeutic window – the time when the application of appropriate therapy can save the penumbra and thus reduce the clinical effects of a stroke.

In addition, attention has been paid to endogenous protective and repair processes occurring in stroke. One of the endogenous substances with potential protective properties are neuropeptides, which under physiological conditions play the role of co-transmitters or neuromodulators and are also activated in response to brain damage and in the course of neurodegenerative diseases. One of them is neuropeptide Y (NPY). Activation of Y2 receptors (Y2R) of this neuropeptide has been shown in many *in vitro* and *in vivo* studies to reduce the release of excitatory neurotransmitters – the main mediators of excitotoxicity leading to brain cell death after ischemia and in neurodegenerative diseases.

This research constituting the foundations of this dissertation aims to explain the basis of the neuroprotective action of the specific agonist of the Y2 receptor – the C-terminal fragment of the neuropeptide Y molecule – NPY(13–36) *in vivo*, in the model of a middle

cerebral artery occlusion with reperfusion (MCAOR), in Sprague-Dawley (SD) normotensive rats and genetically hypertensive rats (SHR). The specific objectives of the study include determining the effect of NPY(13–36) administered to the right lateral ventricle of the brain 30 minutes after the start of ischemia or 30 minutes after the start of reperfusion on: i) the size of the area of the brain damaged by ischemia and reperfusion; ii) selected gait parameters and spontaneous motor activity; iii) microcirculatory response in the ischemic penumbra to an increase in arterial CO<sub>2</sub> partial pressure and administration of a nitric oxide synthase inhibitor; iv) the density of the microcirculatory vessels in the penumbra; v) the level of the leakage of the blood-brain barrier in the ischemic penumbra. The studies were carried out on 3-month-old male SD (n = 67) and SHR (n = 62) rats. A pool of rats in each strain was randomly assigned to one of the following four groups: SHAM group (sham ischemia); control group (ischemia and administration to the lateral ventricle of the brain of 6 µl 0.9% NaCl); group with NPY(13–36) administered 30 minutes after the start of ischemia; group with NPY(13–36) administered 30 minutes after the start of reperfusion. NPY(13–36) was administered to the lateral ventricle of the brain at a dose of 10 µg (6 µl of a solution in 0.9% NaCl).

The right middle cerebral artery occlusion (90 minutes) and reperfusion were performed under inhalation anesthesia (70%N<sub>2</sub>O/30%O<sub>2</sub>/2–2.5% isoflurane). The level of ischemia was monitored by measuring the microflow in the cerebral cortex (LDF, laser-Doppler flow) at the ischemic core or the core and in the ischemic penumbra area. On the third day after reperfusion, behavioral tests were performed, including the assessment of gait on a horizontal platform (CatWalk 7.1 test) and spontaneous motor activity (open field test). The performance on these tests after ischemia or ischemia with NPY(13–36) treatment was compared with the performance before the ischemia (a control recording was performed on the day before ischemia). Seventy-two hours after reperfusion, the extent of brain damage was also assessed by staining brain slices with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). Meta-analyses were applied for intergroup comparisons with regard to the size of this damage within the strains and comparisons between the strains. Seventy-two hours after reperfusion, some animals from each group in either strain were perfused intracardially with a 4% paraformaldehyde solution. Their brains were prepared for immunofluorescence assessment of the ischemic penumbra in a confocal microscope. Brain sagittal sections were stained with antibodies against the endothelium marker RECA-1 (for the smallest blood vessel density evaluation) and rat plasma IgG immunoglobulins (to assess the degree of microvascular leakage – detection of IgG extravasation sites). In the next experimental series, 24 hours after reperfusion, the penumbral LDF responses to hypercapnia (chemical regulation) and the

blockade of nitric oxide synthases (nitric oxide-dependent regulation of basal vascular tone) were assessed. In these experiments, continuous arterial blood pressure measurement was carried out using the direct method. For the study of chemical regulation, a stimulus in the form of 5% CO<sub>2</sub> added to the respiratory gas mixture was used. In the same experiment, after the hypercapnia test and 30 minutes of stabilization of LDF in normocapnia, an endothelial function test was performed by evaluating the response to intravenous administration of a 30 mg/kg dose of L-arginine methyl ester (L-NAME).

Statistical analyses, with the exception of meta-analyses, were performed using Statistica 8 (StatSoft), descriptive statistics, Student's t-tests, and analyses of variance (ANOVA and MANOVA). Meta-analyses were performed in Review Manager 5.3. The following results were obtained: 1 – the decrease in LDF in the ischemic core (about 80% of the baseline value) during 90 minutes of MCA occlusion and its recovery during reperfusion was comparable in the control group and in rats with NPY(13–36) administered 30 minutes after the onset of ischemia or reperfusion, in both SD and SHR strains; 2 – the decrease in LDF in the penumbra area was about 30% of the baseline value in the control group of SD and SHR rats and remained stable at this level for 90 minutes of ischemia; 3 – administration of NPY(13–36) during ischemia statistically significantly reduced LDF deficit in the penumbra (increase by 14%) in SD rats, which indicates recruitment of microvessels; in SHR rats, administration of NPY(13–36) had no effect on penumbra LDF; 4 – the size of post-ischemic brain damage was significantly more prominent in the control group of SHR rats (damage of  $40.48 \pm 1.41\%$  of the ipsilateral hemisphere) compared to the damage in the control group of SD rats (damage of  $34.4 \pm 1.4\%$  of the ipsilateral hemisphere); in both strains, NPY(13–36) statistically significantly reduced the area of brain damage in each of the administration variants; 5 – in behavioral tests performed 72 hours after reperfusion, similar gait impairment was observed in the control groups of SD and SHR rats, expressed mainly by a reduction in average walking speed, an increase in the step cycle duration, and a marked shortening of the stride length compared to the magnitude of these parameters before ischemia; in the NPY(13–36) groups, the gait parameters improved, the administration of the peptide during ischemia being more effective; the changes observed after ischemia in the open field test were also similar in the control groups of SD and SHR rats; there was an apparent decrease in the mobility of animals manifested by a reduction in the time spent on moving and a decrease of total distance traveled during the 10 minutes of observation time, which resulted in a reduction in walking speed in both groups of rats of SD and SHR strains; NPY(13–36) did not improve the decrease in spontaneous mobility; 6 – microcirculatory response in the



penumbra area to hypercapnia did not change significantly in SD rats 24 hours after reperfusion compared to the response in the SHAM group; in the SHR rats, the LDF response to hypercapnia in the control group was significantly worsened, and the administration of NPY(13–36) did not improve this response; the response of microcirculation in the penumbra to L-NAME administration in the control groups of rats of the SD and SHR strains was statistically significantly reduced in comparison to that of the rats in the SHAM ischemia groups in both strains; NPY(13–36) restored this response only in SHR rats and only when administered during reperfusion; 7 – the immunofluorescence studies with the anti-RECA-1 staining demonstrated that the density of the smallest blood vessels in the cerebral cortex under basic conditions was lower in SHR than in SD rats; 72 hours after reperfusion, the density of microvessels in the cerebral cortex in the penumbra decreased statistically significantly in both SD and SHR rats; after NPY(13–36) administration, the density of microvessels was restored, regardless of the time of the administration of this peptide; 8 – microvessel leakage analysis revealed that under basal conditions SHR rats have approximately three times more leaking vessels than SD rats; after reperfusion, an increase in the number of leaking vessels was noted in both strains of rats; however, administration of NPY(13–36) did not reduce the number of leakage sites.

In conclusion, NPY(13–36) exerts a beneficial protective effect on the ischemic brain at the microcirculation level in both healthy and hypertensive rats. This effect includes: i) increasing the microflow in the cerebral cortex in the penumbra area during ischemia in SD rats, suggesting recruitment of collateral circulation; ii) reducing the area of post-ischemic brain damage, improving gait parameters, and increasing the density of the smallest vessels of the microcirculation in the cerebral cortex in the penumbra area in both SD and SHR rats 72 hours after brain reperfusion (efficacy when administered in both the ischemia and reperfusion phase); iii) improved microcirculatory response in the penumbra to the blockade of nitric oxide synthase in SHR rats (efficacy when administered during the reperfusion phase).

## ***Innowacyjność pracy***

1. Badanie mechanizmów neuroprotekcynowego działania agonisty receptorów Y2R NPY(13-36) na poziomie mikrokążeń *in vivo* u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, będącym znanym czynnikiem ryzyka rozwoju udaru niedokrwiennego u ludzi.
2. Wykazanie, że NPY(13-36) zwiększa dopływ krwi do strefy półcienia ischemicznego w czasie trwania niedokrwienia u szczurów zdrowych.
3. Wykazanie, że NPY(13-36) podany zarówno w czasie niedokrwienia jak i w czasie reperfuzji poprawia sprawność chodu u szczurów zdrowych i szczurów z nadciśnieniem tętniczym.
4. Wykazanie, że NPY(13-36) poprawia regulację mikroprzepływu w korze mózgowej u szczurów z nadciśnieniem tętniczym.
5. Wykazanie, że NPY(13-36) poprawia gęstość sieci naczyń mikrokążeń w strefie półcienia ischemicznego, zmniejszoną w wyniku niedokrwienia mózgu, zarówno u szczurów zdrowych jak i szczurów z nadciśnieniem tętniczym, przy czym jest skuteczny po podaniu w czasie reperfuzji.
6. Zastosowanie własnej metody analizy wyników umożliwiającej ocenę rekrutacji kążenia obocznego do strefy półcienia w przebiegu niedokrwienia.
7. Zastosowanie metaanalizy do wnioskowania o porównywalnym działaniu ochronnym NPY(13-36) na mózg poddany niedokrwieniu i reperfuzji u szczurów zdrowych i z nadciśnieniem tętniczym.



# ***1. WSTĘP***

## ***1.1. Wprowadzenie***

Udar niedokrwienny mózgu jest jednym z głównych problemów zdrowotnych i społeczno-ekonomicznych starzejącej się populacji krajów uprzemysłowionych. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że każdego roku około 15 milionów ludzi na całym świecie doznaje udaru niedokrwiennego mózgu, z czego 5 milionów umiera [WHO, 2004]. Najczęściej występującym rodzajem udaru niedokrwiennego mózgu (85% wszystkich przypadków) jest ogniskowy udar niedokrwienny. Powstaje on nagle, najczęściej w wyniku zakrzepu tworzącego się w naczyniu mózgowym (główne pnie naczyniowe, małe naczynia przeszywające lub naczynia żyłne) lub zatoru (skrzepu) pochodzącego z serca, łuku aorty lub tętnic szyjnych. Zator w 80% przypadków lokalizuje się w tętnicy środkowej mózgu.

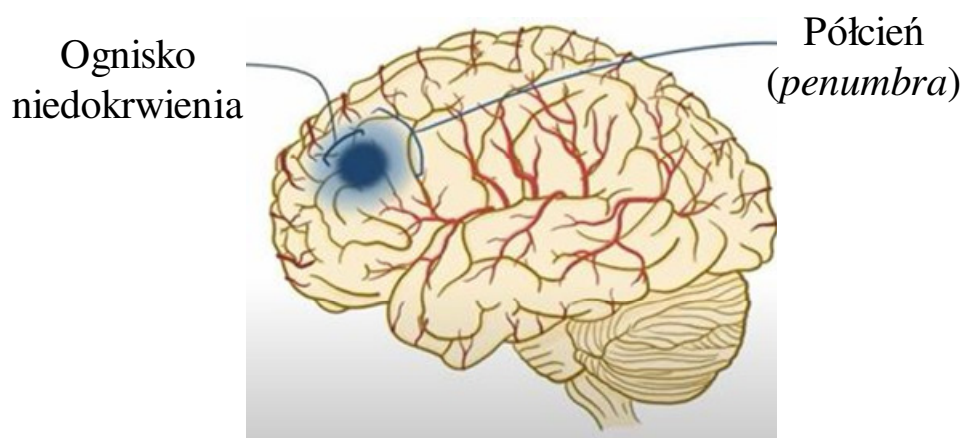
Ogniskowy udar niedokrwienny jest trzecią, co do częstości, przyczyną zgonów na świecie. Powyżej 50% osób, które przeżyły ostrą fazę udaru pozostaje niepełnosprawnymi, napotykając trudności w wykonywaniu codziennych czynności [Olsen i wsp., 2003; Kim i wsp., 2020].

Według statystyk WHO, w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, wśród osób które przeżyły udar, 6 miesięcy od momentu jego wystąpienia 48% przejawia niedowład połowiczny, 22% nie może chodzić, od 24% do 53% zgłasza całkowitą lub częściową zależność od innych osób. Opiekę nad chorym najczęściej przejmują członkowie bliskiej rodziny. Średnie koszty opieki zdrowotnej w 2016 roku (pacjenci szpitalni i leczeni ambulatoryjnie) z powodu różnego typu udaru szacuje się na 38 mld USD. Koszty te nie obejmują dodatkowych strat związanych ze skutkami społecznymi po udarze (nieobecność w pracy, przedwczesny zgon) [Girotra i wsp., 2020]. W Polsce, w 2015 roku ze środków finansowych Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ), na leczenie udarów mózgu wydano 655,4 mln PLN. Jednocześnie szacuje się, że wydatki związane z rentami z tytułu niezdolności do pracy z powodu przebytego udaru mózgu wyniosły 1 mld PLN [Raciborski i wsp., 2016]. Przytoczone dane dają ogólny obraz społecznej wagi problemu, jakim jest udar mózgu. Perspektywy nie wyglądają optymistycznie, ponieważ zapadalność na tę chorobę wzrasta [GBD 2019 Stroke Collaborators, 2021].

Obecnie nie ma opracowanego farmakologicznego leczenia pacjentów z ostrym udarem mózgu. Leczenie udaru w ostrej fazie to próba rewaskularyzacji i reperfuzji mózgu w celu ograniczenia skutków niedokrwienia. Dalsza procedura leczenia koncentruje się na rehabilitacji i opóźnianiu progresji chorób naczyniowych (nadciśnienie tętnicze, miażdżyca),

a także zapobieganie kolejnym udarom. Zatem, jedyne obecnie dostępne leczenie ostrego udaru niedokrwiennego mózgu ogranicza się do stosowania „metod reperfuzyjnych”, tj. dożylnego lub dotętniczego podania środka trombolitycznego, takiego jak rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (rt-PA, alteplaza), albo mechanicznego usunięcia zatoru poprzez interwencję wewnątrznaczyniową, lub połączenia obu tych metod [Taschner i wsp., 2011; Samaniego i wsp., 2012]. Terapie te wiążą się z ryzykiem powikłań, takich jak ukrwotoczenie udaru i wtórny obrzęk mózgu, które mogą dodatkowo pogorszyć stan pacjentów lub nawet doprowadzić do ich śmierci [Sussman i wsp., 2013]. Należy ponadto zaznaczyć, że dostępne metody nie są uniwersalne, bowiem tylko około 5% wszystkich ostrych udarów kwalifikuje się do leczenia fibrynolitycznego [Suzuki i wsp., 2016] i mniej niż 10% do trombektomii [Cohen i wsp., 2015]. Wynika to z faktu, że współwystępujące choroby, takie jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca i dyslipidemia, będące czynnikami ryzyka wystąpienia udaru, istotnie zwiększają ryzyko wystąpienia skutków ubocznych zastosowania leczenia fibrynolitycznego [Levy i wsp., 1994; Miller i wsp., 2011; Nardi i wsp., 2011]. Pomimo świadomości wymienionych wyżej skutków ubocznych stanowiących znaczne ograniczenie metodologiczne *per se* wczesnego leczenia udaru niedokrwiennego mózgu za pomocą trombektomii poprzedzonej fibrylizacją, obecnie nie ma innego sposobu leczenia [Granger i wsp., 2017].

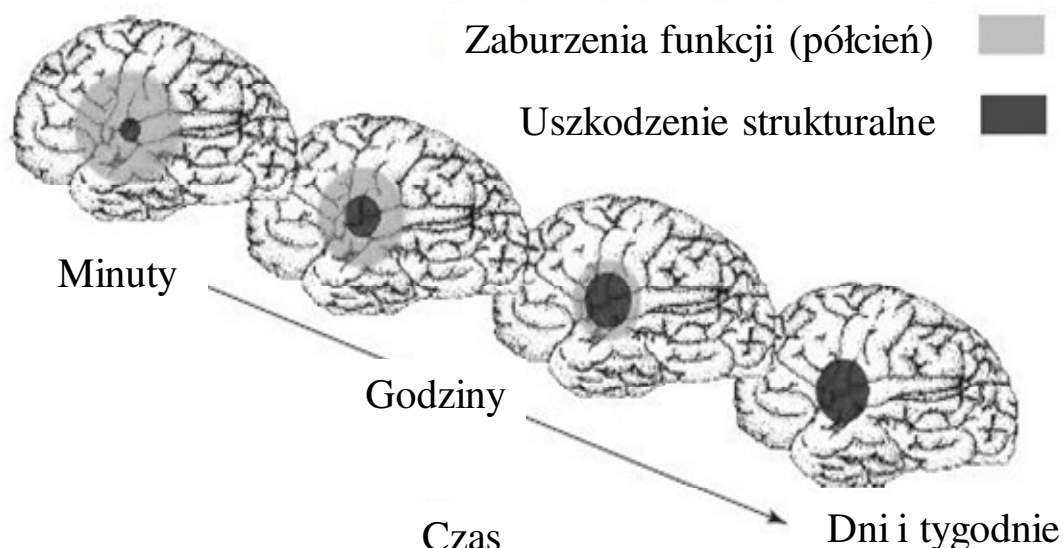
Należy podkreślić, że stosowanie rt-PA jest ograniczone przez wąskie okno terapeutyczne i ryzyko wymienionych powikłań [Hacke i wsp., 2008].



**Rycina 1.** Przestrzenne zróżnicowanie obszaru niedokrwienia na: ognisko niedokrwienia i strefę półcienia (penumbry). Podstawą tego zróżnicowania jest stopień upośledzenia przepływu krwi i związanych z nim zmian w strukturze i funkcji komórek. W ognisku niedokrwienia spadek przepływu krwi wynosi ok. 80% przepływu wyjściowego (w regionie tym dochodzi do strukturalnego uszkodzenia komórek), natomiast w strefie półcienia przepływ krwi obniża się o ok. 60-50% (region ten charakteryzuje się zaburzeniem funkcji przy zachowanej strukturze). Źródło ryciny: [https://www.osmosis.org/learn/Ischemic\\_stroke](https://www.osmosis.org/learn/Ischemic_stroke) (dostęp 10.01.2022, zmodyfikowano).

Dlatego też intensywnie trwają badania nad znalezieniem środków wspomagających leczenie udaru niedokrwiennego mózgu, które zwiększałyby skuteczność terapii trombolitycznej poprzez zminimalizowanie narażenia pacjentów na powikłania, co uczyniłoby terapię trombolityczną dostępną dla większej liczby pacjentów.

W czasie pierwszych sekund/minut ogniskowego niedokrwienia mózgu obszar niedokrwienny różnicuje się czasowo-przestrzennie na ognisko niedokrwienia (ang. *Infarct core* lub *ischemic core*) i strefę półcienia/penumbry (ang. *Periinfarct penumbra* lub *ischemic penumbra*), co schematycznie przedstawiono na Rycinie 1. Ognisko niedokrwienia to obszar, w którym przepływ krwi zmniejsza się o ponad 80% w stosunku do wartości prawidłowej, a komórki mózgu ulegają szybkiemu i nieodwracalnemu uszkodzeniu i śmierci, najczęściej w procesie nekrozy. W tym samym czasie w strefie półcienia, dochodzi do stopniowego, postępującego zaburzenia funkcji i w konsekwencji ich stopniowej śmierci w miarę upływu czasu. Wraz z upływem czasu szanse zastosowania skutecznej reperfuzji drastycznie maleją, a jednocześnie coraz większe partie strefy półcienia są stopniowo rekrutowane do ogniska niedokrwienia w wyniku działania czynników rozprzestrzeniających się ze strefy ogniska zawału (Rycina 2). Dlatego celem terapii w przypadku ogniskowego udaru niedokrwiennego jest ratowanie strefy półcienia; dotyczy to zarówno neuroprotekcji wspomagającej leczenie reperfuzyjne – jak i właściwej neuroprotekcji, polegającej na hamowaniu postępu kaskady niedokrwiennej.



**Rycina 2.** Czasowo-przestrzenna ewolucja niedokrwiennego uszkodzenia mózgu. Uszkodzenie strukturalne powiększa się w czasie dni/tygodni, rekrutując kolejne frakcje strefy półcienia do ogniska niedokrwiennego (wg Dirnagl i wsp., 2003, zmodyfikowano).

Pomimo dużego postępu w rozumieniu patomechanizmów uszkodzenia niedokrwiennego mózgu i obiecujących wyników badań podstawowych nad neuroprotekcją, do tej pory, jak wspomniano wyżej, nie udało się znaleźć skutecznej terapii farmakologicznej, którą można by zastosować w udarze u ludzi. Jedną z prawdopodobnych przyczyn braku powodzenia w tym zakresie może być fakt, że eksperymenty na modelach zwierzęcych (*in vivo*) w większości obejmowały młode i zdrowe zwierzęta, bądź pozyskane od nich komórki/tkanki (*in vitro*). W piśmiennictwie dotyczącym badań doświadczalnych nad ogniskowym udarem mózgu jest stosunkowo niewiele publikacji opisujących wyniki uzyskane na zwierzęcych modelach nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, hiperlipidemii lub arytmii serca, tzn. chorób będących czynnikami ryzyka rozwoju udaru mózgu [Kuklina i wsp., 2012; Neuhaus i wsp., 2017]. Ponadto, do niedawna badania nad poszukiwaniem farmakologicznej protekcji mózgu przed skutkami niedokrwienia, w zdecydowanej większości ogniskowały się na ochronie neuronów z pominięciem innych komórek obecnych w mózgu, takich jak glia i naczynia krwionośne, które również są dotknięte niedokrwieniem [del Zoppo, 2009; Iadecola i wsp., 2012]. Brak kompleksowej ochrony może być istotną przyczyną niepowodzenia eksperymentalnych strategii neuroprotekcyjnych, testowanych w badaniach klinicznych.

Substancje o działaniu neuroprotekcijnym, oceniane dotychczas w badaniach klinicznych, celowały zazwyczaj w mechanizmy związane bezpośrednio z ekscytotoksycznością kwasu glutaminowego, czyli z neurotoksycznym działaniem wysokich stężeń tego neurotransmitera i związanym z nimi znacznym napływem jonów wapnia do komórek nerwowych, prowadzącym do aktywacji enzymów degradujących białka, błony i kwasy nukleinowe oraz rozwoju obrzęku komórkowego. Były to: blokery jonotropowych receptorów glutaminianergicznych (aktywowanych N-metylo-D-asparaginianem, NMDA), blokery kanałów napływu jonów wapnia do komórki; cząsteczki minimalizujące rozwój stanu zapalnego; zmiatacze wolnych rodników oraz inhibitory wewnątrzkomórkowych enzymów katabolicznych. W większości przypadków pacjenci nie odnieśli żadnych korzyści terapeutycznych, a w niektórych przypadkach stan pacjentów po terapii był gorszy niż w grupie otrzymującej placebo [Shah i wsp., 2007; Ginsberg, 2008; Zhang i wsp., 2012].

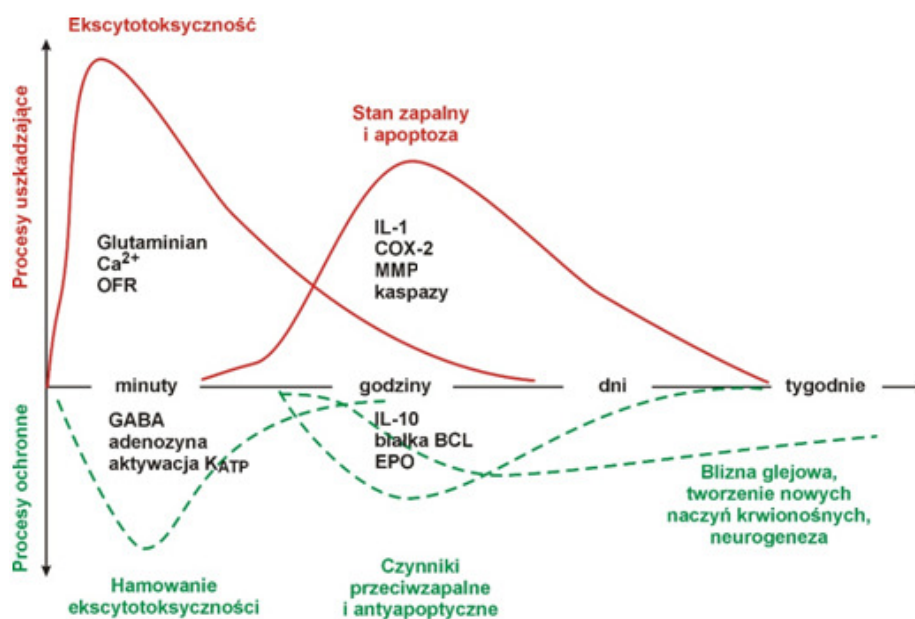
Dzięki nagromadzonej wiedzy, dotyczącej mechanizmów i czynników ryzyka udaru niedokrwiennego, stało się jasne, że badania podstawowe powinny uwzględniać złożoność patofizjologii niedokrwiennej u ludzi i towarzyszących jej chorób.

Podjęcie do neuroprotekcji uległo zmianie, gdy wprowadzono koncepcję jednostki

nerwowo-naczyniowej (NVU, ang. *Neurovascular unit*), uwzględniającą istnienie silnego i unikalnego, strukturalnego i czynnościowego sprzężenia między komórkami mózgu: neuronami i komórkami gleju gwiaździstego (astrocyty) oraz naczyniami mikrokrążenia [Dirnagl i wsp., 2003].

Pomimo 20 kolejnych lat badań doświadczalnych dotyczących wpływu niedokrwienia mózgu na elementy NVU, do tej pory nie zaproponowano żadnej terapii ukierunkowanej na ochronę NVU u pacjentów w ostrej fazie udaru niedokrwiennego mózgu [STAIR XI, Lyden i wsp., 2021].

Od ponad 20 lat zwraca się także uwagę na terapię oparte na endogennych procesach ochronnych i naprawczych [Dirnagl i wsp., 2003]. Procesy te, zachodzące równolegle z niszczącą kaskadą ekscytotoksyczności, przeciwdziałają jej oraz wzmacniają odpowiedź przeciwzapalną i przeciwapoptoczną, promując naprawę/regenerację uszkodzonych tkanek mózgu. Do najlepiej poznanych czynników endogennych przeciwdziałających ekscytotoksyczności należą: hamujący neuroprzekaznik GABA (kwas gamma aminomasłowy) i adenozyne oraz aktywacja kanałów potasowych wrażliwych na adenozyneotryfosforan (ATP), Rycina 3.



**Rycina 3.** Ogniskowe niedokrwienie mózgu indukuje złożoną serię zdarzeń, które uszkadzają komórki mózgowe (opis w tekście). W odpowiedzi na uszkodzenie zostają pobudzone endogenne mechanizmy ochronne i naprawcze. W niedokrwionym obszarze, komórki w strefie okołozawałowej mogą zostać uratowane dzięki zwiększeniu dopływu substratów energetycznych w wyniku rekrutacji krążenia obocznego, spontanicznej lub terapeutycznej reperfuzji i waskulogenezie oraz pobudzeniu komórkowych mechanizmów ochronnych (wg Dirnagl, 2003, zmodyfikowano).

Skróty oznaczają: COX-2 – cykloksygenaza 2, EPO – erytropoetyna, GABA – kwas gamma aminomasłowy, IL-1 – prozapalna interleukina 1, IL-10 – przeciwzapalna interleukina 10,  $K_{ATP}$  – kanał potasowy zależny od ATP, MMP – metaloproteiny, OFR – wolne rodniki tlenowe.



Spośród czynników o charakterze przeciwzapalnym należy wymienić interleukinę 10 (IL-10), białka BCL i erytropoetynę (EPO). Białka BCL zasługują w tym miejscu na chwilę szczególnej uwagi. Wykazano bowiem, że działają one ochronnie na komórki endotelium mózgowych naczyń krwionośnych, co zabezpiecza szczelność bariery krew-mózg i homeostazę środowiska komórek nerwowych [Zhang i wsp., 2013]. Bcl-2 i Bcl-xL działają antyapoptotycznie oraz hamują procesy zapalne w śródbłonku dzięki zmniejszeniu aktywności NF- $\kappa$ B (ang. *Nuclear factor kappa B*), czynnika prowadzącego do śmierci komórek endotelium [Badrichani i wsp., 1997; Michiels i wsp., 1999].

Jedną z klas substancji endogennych o potencjalnych właściwościach ochronnych i naprawczych są neuropeptydy, które w warunkach fizjologicznych pełnią rolę kotransmiterów lub neuromodulatorów, a także są aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenie mózgu oraz w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych i psychiatrycznych [Hököfelt i wsp., 2003; Eaton i wsp., 2007; Li i wsp., 2019]. Ze względu na brak specyficznych mechanizmów wychwytu zwrotnego i ich unikalną kinetykę, neuropeptydy wywierają długotrwałe działanie. Jednym z neuropeptydów, powszechnie występującym w mózgu i wykorzystywanym przez wiele układów neuronalnych, jest neuropeptyd Y (NPY) [Michel i wsp., 1998; Holzer i wsp., 2012].

W biologicznym działaniu tego peptydu u ssaków pośredniczy 5 typów specyficznych receptorów błonowych sprzężonych z białkiem G, oznaczonych: Y1, Y2, Y4, Y5 i y6 [Michel i wsp., 1998; Bettio i wsp., 2001]. Dotychczas sklonowano pięć receptorów NPY u ssaków: Y1, Y2, Y4, Y5 i y6, ale tylko cztery z nich funkcjonują u ludzi (Y1, Y2, Y4, Y5). Uważa się, że y6 jest nieaktywny u naczelnych i u szczura, a aktywny u królików i myszy. Istnienie dodatkowego podtypu receptora NPY (Y3) zostało zasugerowane na podstawie badań farmakologicznych, przeprowadzonych na kilku typach tkanek ludzkich, szczurzych i króliczych [Pedragosa-Badia i wsp., 2013].

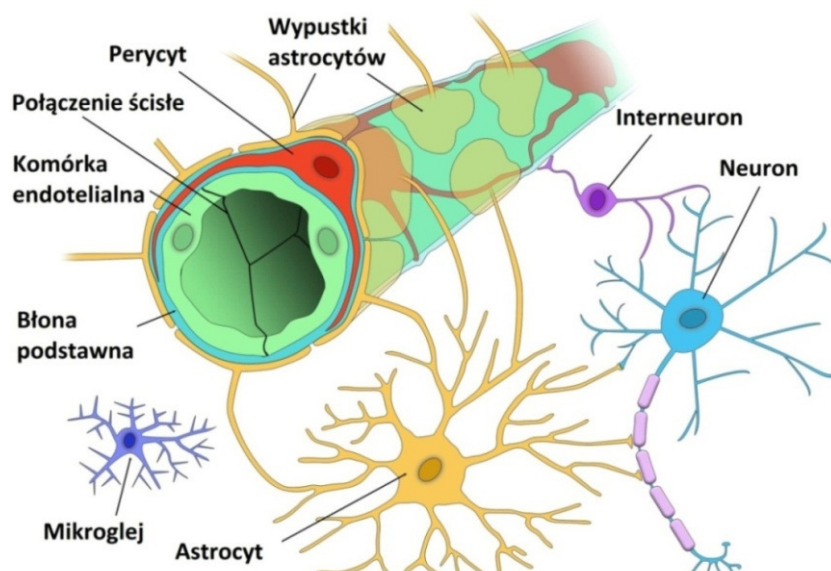
W dalszej części wstępu omówię aktualny stan wiedzy o procesach odpowiedzialnych za uszkodzenie NVU w przebiegu ogniskowego niedokrwienia mózgu, opiszę właściwości jakie powinna posiadać idealna substancja skutecznie chroniąca NVU przed uszkodzeniem niedokrwieniem oraz dowiodę, że ligandy receptorów Y2 (Y2R) wykazują wiele cech takiej substancji.

## 1.2. Mechanizmy uszkodzenia jednostki nerwowo-naczyniowej w wyniku niedokrwienia i reperfuzji mózgu

### 1.2.1. Procesy ekscytotoksyczności, depolaryzacji okołozawałowych i zapalenia, rola jonów wapnia

NVU stanowi najmniejszy strukturalny i czynnościowy element mózgu, na poziomie którego zapewnione jest odpowiednie, dostosowane do zapotrzebowania, zaopatrzenie komórek nerwowych w substraty energetyczne (Rycina 4). Jest to struktura, w skład której wchodzi neuron, astrocyty i komórki śródbłonka naczyń włosowatych. Komórki śródbłonka wraz z oplatającymi je okołonaczyniowymi wypustkami astrocytów, perycytami i macierzą zewnątrzkomórkową tworzą barierę krew-mózg (BBB, ang. *Blood-brain barrier*). Te elementy strukturalne są ściśle i wzajemnie ze sobą powiązane, zapewniając homeostazę mózgu, w tym odpowiedni system kontroli mikroprzepływu krwi [Iadecola, 2017]. Dezintegracja i dysfunkcja NVU w warunkach niedokrwienia prowadzi do utraty normalnej funkcji niedokrwionego obszaru mózgu.

Procesy wywołane niedokrwieniem, zachodzące w ognisku zawału obejmują krytyczny deficyt wytwarzania ATP, którego następstwem jest znaczny spadek aktywności  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazy, a tym samym niezdolność komórek nerwowych do utrzymania potencjału błonowego. Skutkiem krytycznego zmniejszenia aktywności  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazy jest kumulacja jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach oraz wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $\text{K}^+$  [Major i wsp., 2017].



**Rycina 4.** Schemat ilustrujący komponenty jednostki nerwowo-naczyniowej. Ściana naczyń włosowatych (kapilar) składa się z pojedynczej warstwy komórek śródbłonka, połączonych złączami ścisłymi. Komórki śródbłonka wraz z perycytami, błoną podstawną i wypustkami astrocytów tworzą barierę krew-mózg. Neurony pobudzające tworzą synapsy zarówno z interneuronami, jak i z astrocytami – które to z kolei wysyłają sygnały chemiczne, umożliwiające dostosowanie przepływu krwi przez naczynia włosowate do metabolicznego zapotrzebowania danej okolicy mózgu. Komórki mikrogleju, towarzyszące NVU, są aktywowane w sytuacjach zagrożenia, takich jak np. niedokrwienie, niedotlenienie. Wszystkie elementy NVU tworzą ścisłą anatomiczną i funkcjonalną całość (wg Brown i wsp., 2019, zmodyfikowano).

W licznych badaniach wykazano, że ograniczeniom energetycznym w mózgu towarzyszy także zaburzenie homeostazy  $K^+$  zależnej od astrocytów [Leis i wsp., 2005; Pietrobon i wsp., 2014; Milton i wsp., 2018]. Spadek aktywności astrocytarnej  $Na^+/K^+$ -ATPazy jest jedną z głównych przyczyn załamania homeostazy jonów  $K^+$  w astrocytach [Iadecola, 2017; Du i wsp., 2018]. Ostatecznie wypływ jonów  $K^+$  z komórek nerwowych oraz utrata zdolności astrocytów do buforowania tych jonów w warunkach niedokrwienia skutkują akumulacją jonów potasu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co prowadzi do niekorzystnego zwiększenia pobudliwości komórek nerwowych [Su i wsp., 2002; Lenart i wsp., 2004, Hossmann, 2006; Pietrobon i wsp., 2014]

Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$  w neuronach pobudzających powoduje nadmierne uwalnianie pobudzającego aminokwasu – glutaminianu, wytwarzanie wolnych rodników tlenowych i azotowych oraz aktywację enzymów katabolicznych zależnych od  $Ca^{2+}$ . Gromadzenie się i dyfuzja glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej prowadzi do ekscytotoksyczności, natomiast wspomniane wyżej zwiększenie pozakomórkowego stężenia jonów potasu wraz z glutaminianem wywołują depolaryzacje okołozawałowe (PID, ang. *Periinfarct depolarizations*) [Dirnagl i wsp., 1999; Choi, 2020].

Zarówno nadmiernie uwalniany glutaminian, jak i PID są głównymi czynnikami, które stopniowo rekrutują strefę penumbry do ogniska martwicy (Rycina 2). Glutaminian, dyfundując w przestrzeni śródmiąższowej, dociera do strefy półcienia i pobudza receptory jonotropowe i metabotropowe w sposób нефизjologiczny, nadmierny i długotrwały, powodując deficyt energii, napływ  $Ca^{2+}$  do cytozolu, a następnie stopniową śmierć komórek znajdujących się w strefie półcienia, w wyniku aktywacji enzymów katabolicznych zależnych od  $Ca^{2+}$  i procesu apoptozy [Leist i wsp., 1998; Iadecola, 2017]. Utrata energii oraz homeostazy jonowej zakłóca komunikację neuronów z komórkami glejowymi i śródbłonkiem. Astrocyty poddane toksycznemu działaniu nadmiernego stężenia glutaminianu, podobnie jak neurony, cierpią z powodu przeciążenia wapniem, ulegają obrzękowi cytotoksycznemu i dochodzi w nich, podobnie jak w neuronach, do depolaryzacji mitochondriów i generacji wolnych rodników [Matute i wsp., 2006]. Ponadto, naczynia mikrokrążenia w strefie półcienia tracą swoją fizjologiczną regulację z powodu upośledzenia funkcji komórek śródbłonka/mięśni gładkich spowodowanego stresem oksydacyjnym/nitrozacyjnym, wzmocnionym przez postępujące procesy zapalne [del Zoppo i wsp., 2003; Palomares i wsp., 2011]. W konsekwencji ekscytotoksyczność powoduje rozpad i dysfunkcję jednostki nerwowo-naczyniowej.

Przejęciowe epizody PID, rozprzestrzeniające się z ogniska zawału do strefy półcienia, również sprzyjają powiększaniu obszaru martwicy. Wykazano, że wielkość obszaru martwicy po ogniskowym niedokrwieniu mózgu jest dodatnio skorelowana z liczbą epizodów PID [Lauritzen i wsp., 2011; Pietrobon i wsp., 2014]. Epizody PID powodują uszkodzenie NVU w wyniku aktywacji metaloproteinaz i przerwania ciągłości BBB [Gursoy-Ozdemir i wsp., 2004]. Stopień uszkodzenia BBB w wyniku niedokrwienia i nasilenie obrzęku naczyniopochodnego korelują z liczbą epizodów PID [Gursoy-Ozdemir i wsp., 2004]. Epizody PID mogą również pogłębiać obniżenie mikroprzepływu w korze mózgowej w penumbrze, w wyniku zwężenia naczyń mikrokrążenia [Chang i wsp., 2010; Menyhárt i wsp., 2017; Menyhárt i wsp., 2018]. Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej komórek śródbłonna mikrokronaczyń przez metaloproteinazy i zmniejszona synteza integryny  $\alpha_6\beta_4$  w astrocytach zaburzą komunikację między astrocytami a śródbłonkiem [del Zoppo i wsp., 2010].

Istotną rolę w pogorszeniu stanu hemodynamiki w strefie półcienia odgrywa też obrzęk powstający w ognisku udaru w wyniku wewnątrzkomórkowej kumulacji jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , skutkującej powstaniem gradientu osmotycznego skierowanego dokomórkowo. Gradient osmotyczny powoduje bierny napływ wody do komórek z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co prowadzi do obrzęku cytotoksycznego [Dirnagl w wsp., 1999; Badaut i wsp., 2011]. Obrzęk w ognisku niedokrwienia może powodować ucisk naczyń mikrokrążenia w strefie półcienia w pobliżu ogniska zawału, co dodatkowo upośledza perfuzję tego obszaru. Ponadto, obrzęk komórek może dekompensować wewnątrzczaszkową równowagę objętościowo-ciśnieniową, powodując wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego i wtórną kompresję naczyń krwionośnych.

Uszkodzenie NVU w strefie półcienia może ulec pogłębieniu w momencie reperfuzji [Aronowski i wsp., 1997; Kuroda i wsp., 1997; Granger i wsp., 2017]. Zjawisko to, znane jako uszkodzenie reperfuzyjne, ma wieloczynnikową etiologię. Po pierwsze, podczas reperfuzji wielokrotne epizody PID oraz cykle przekrwienia-hipoperfuzji, z podwyższeniem zewnątrzkomórkowego stężenia jonów potasu do poziomu wywołującego skurcz naczyń krwionośnych, pogłębiają dezintegrację jednostki nerwowo-naczyniowej [Menyhárt i wsp., 2018]. Po drugie, reperfuzja i epizody PID mogą również prowadzić do dysfunkcji prostowniczych kanałów potasowych (Kir) w naczyniach, co przyczynia się do pogorszenia sprzężenia nerwowo-naczyniowego [Bastide i wsp., 1999; Pétrault i wsp., 2004; Seitz i wsp., 2004]. W uszkodzeniach reperfuzyjnych kluczową rolę odgrywają również leukocyty (stan zapalny), aktywowane m.in. przez stres oksydacyjny podczas przywracania perfuzji tkanek.

Martwe i umierające komórki obszaru niedokrwienia mózgu indukują procesy stanu zapalnego, poprzez uwolnienie do otoczenia cząsteczek aktywujących komórki mikrogleju, komórki śródbłonna naczyń krwionośnych mózgu, astrocyty, a w kolejnych etapach, naciekające leukocyty. Cząsteczki te nazwane DAMPs (ang. *Danger/damage associated molecular patterns*) są reprezentowane przez ATP, HMGB1 (ang. *High mobility group box 1*) i HSP60 (ang. *Heat shock protein 60*). Komórki mikrogleju, leukocyty, astrocyty i neurony oraz komórki śródbłonna posiadają błonowe receptory dla cząsteczek DAMPs. Aktywacja tych receptorów wyzwała serię procesów prowadzących do ekspresji genów prozapalnych i zmiany fenotypu spoczynkowego mikrogleju w ameboidalny M1. Mikroglej przekształca się, namnaża, rearanżuje cytoszkielet i nabywa zdolności do migracji i fagocytozy. Cząsteczki ATP stymulują receptory purynergiczne P2X7. Inne cząsteczki DAMPs stymulują receptory CD36 (ang. *Cluster of differentiation 36*), TLR4 (ang. *Toll-like receptor 4*) i TLR2 (ang. *Toll-like receptor 2*), RAGE (ang. *Receptor for advanced glycation end products*) oraz receptory dla HSP60. W wyniku aktywacji wyżej wymienionych receptorów, czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B wyzwała ekspresję genów kodujących cząsteczki prozapalne, w tym: IL-1 $\beta$  (interleukina-1 $\beta$ ), IL-6 (interleukina 6), IL-8 (interleukina 8), IL-18 (interleukina 18) i TNF- $\alpha$  (ang. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ). W ekspresję genów prozapalnych jest zaangażowany także czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *Activator protein 1*), ważny aktywator ekspresji IL-1 i TNF- $\alpha$  oraz ekspresji niektórych cząsteczek adhezyjnych – umożliwiających przejście leukocytów przez naczynia krwionośne (głównie przez żyłki) do tkanek mózgu [Przykaza, 2021].

Leukocyty uwalniają metaloproteinazy, które degradują macierz zewnątrzkomórkową i białka strukturalne ścisłych połączeń bariery krew-mózg [Jourquin i wsp., 2003]. Nieszczelność bariery krew-mózg jest powodem obrzęku naczyniopochodnego oraz pozwala większej liczbie leukocytów infiltrować tkanki mózgowie, w których uwalniają one cytokiny prozapalne i znacznie przyczyniają się do zaostrzenia toczącego się stanu zapalnego [Pan i wsp., 2008]. Ponadto, aktywowane leukocyty wykazują ekspresję cząsteczek adhezyjnych i oddziałują z agregującymi płytkami krwi, tworząc kompleksy, które przylegają do wewnętrznych ścian naczyń włosowatych i żyłek, powodując niedrożności w naczyniach mikrokrążenia [del Zoppo i wsp., 2003; Ritter i wsp., 2000]. Dodatkowo, aktywowane płytki krwi mogą uwalniać czynniki zwężające naczynia, takie jak ATP i tromboksan A<sub>2</sub> oraz mediatory chemotaktyczne, przyciągające migrujące leukocyty [Okada i wsp., 1994; Zeller i wsp., 2005]. Ze względu na powyższe zjawiska, mikronaczynia nie będą właściwie perfundowane pomimo pomyślnej rekanalizacji zaczopowanego, większego naczynia

macierzystego (ang. *No-reflow effect*). Brak efektywnego mikroprzepływu, mimo reperfuzji, może być również spowodowany kompresją mikronaczyń przez obrzmiałe okołonaczyniowe wypustki astrocytów (ang. *Astrocyte endfeets*). Aktywowane leukocyty wytwarzają wolne rodniki tlenowe, głównie anion ponadtlenkowy ( $O^{2-}$ ). Głównym enzymem wytwarzającym  $O^{2-}$  znajdującym się w leukocytach i makrofagach jest oksydaza NADPH, która również występuje obficie w komórkach śródbłonna stymulowanych przez cytokiny w warunkach zwiększonego wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$  [Miller i wsp., 2006; Radermacher i wsp., 2013]. Anion ponadtlenkowy oddziałuje z tlenkiem azotu, tworząc silnie toksyczny wolny rodnik azotowy – nadtlenoazotyn [Beckman i wsp., 1996]. Wszystkie te procesy mogą prowadzić do ukrwotoczenia obszaru niedokrwienego podczas reperfuzji i przyczyniać się do nasilenia uszkodzeń BBB, naczyniopochodnego obrzęku mózgu i zwiększenia napływu leukocytów do mięszu mózgu.

### ***1.2.2. Hipotetyczna rola cyklicznego adenozynomonofosforanu w procesach uszkodzenia NVU w czasie ostrej fazy niedokrwienia mózgu***

Chociaż głównym wewnątrzkomórkowym mediatorem związanym ze stymulacją receptorów NMDA jest  $Ca^{2+}$ , podczas aktywacji tego receptora wzrasta również wtórnie wewnątrzkomórkowe stężenie cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP). Wzrost stężenia cAMP we wnętrzu komórki następuje poprzez stymulację aktywności cyklazy adenylowej (AC) przez kompleks  $Ca^{2+}$ /kalmodulina [Cooper i wsp., 1995]. Cykliczny AMP jest ważnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem w sygnalizacji związanej z aktywacją receptorów NMDA. Wykazano, że cAMP nasila uwalnianie neuroprzekaźników pobudzających poprzez zwiększenie wydzielania  $Ca^{2+}$  z gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ER) w wyniku fosforylacji receptorów rianodynowych (RyR) przez kinazę białkową A (PKA) i zwiększonego prawdopodobieństwa otwarcia kanałów jonowych w receptorach RyR [Bergantin i wsp., 2015]. Dodatkowo, aktywacja szlaku cyklazy adenylowej/cAMP/PKA ułatwia egzocytozę pęcherzyków synaptycznych [Chavez-Noriega i wsp., 1994]. Ponadto, cykliczny AMP i kinaza białkowa A zwiększają transmisję jonów przez kanał receptora NMDA, co wskazuje, że pobudliwość tego kanału jest zwiększana przez fosforylację zależną od PKA [Westphal i wsp., 1999]. Podobnie aktywacja sygnalizacji AC/cAMP w neuronach prądkowia ułatwia transmisję kora-prądkowie i nasila pobudzające efekty aktywacji receptorów NMDA i AMPA [Threlfell i wsp., 2013]. Powszechnie wiadomo, że neurony zlokalizowane w prądkowiu syntetyzują duże ilości cyklazy adenylowej, a wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP zwiększa ich pobudzenie [Colwell i wsp., 1995;

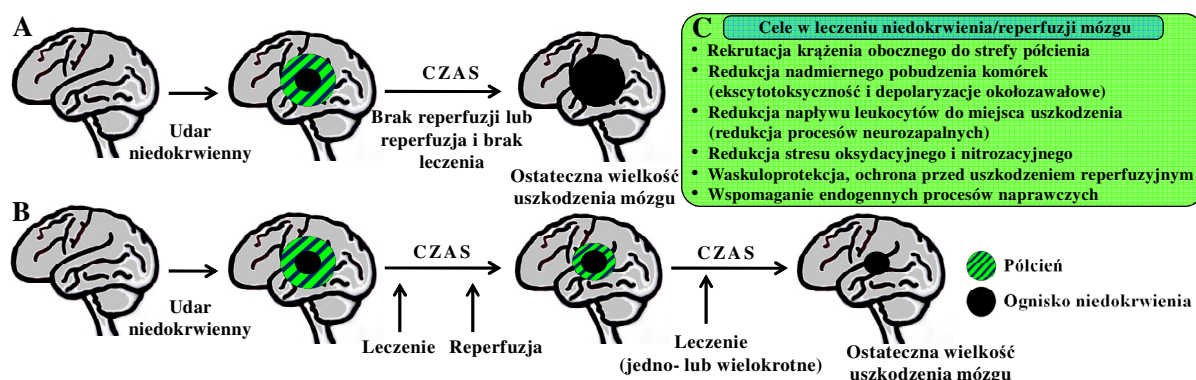
Threlfell i wsp., 2009]. Co ważne, wzrost aktywności AC i wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP obserwowano również w modelach niedokrwienia mózgu [Domańska-Janik i wsp., 1992]. To pobudzenie komórkowe może się nasilać poprzez hamowanie przewodnictwa wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych (Kir) poprzez aktywację szlaku cAMP/PKA [Wang i wsp., 2019]. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP wykryto również w przebiegu zjawiska rozszerzającej się depresji korowej (CSD, ang. *Cortical spreading depression*) wywołanej podaniem KCl na powierzchnię kory mózgowej szczura *in vitro* i *in vivo* [Krivánek, 1976; Krivánek, 1983] oraz w trakcie napadów o charakterze padaczkowym u szczurów podatnych na padaczkę [Tupal i wsp., 2010]. W tym miejscu należy podkreślić, że opisane poprzednio epizody PID są specyficzną podklasą epizodów CSD, pojawiają się one w przypadku ogniskowego niedokrwienia, bądź mechanicznego uszkodzenia mózgu. Z drugiej strony, wzrost stężenia cAMP w astrocytach osłabia wychwyt zwrotny glutaminianu poprzez endocytozę transporterów glutaminianu GLT-1 i GLAST [Nishizaki i wsp., 2002; Guillet i wsp., 2005; Adolph i wsp., 2007]. Wszystkie te procesy wzmacniają i przedłużają pobudzenie neuronu postsynaptycznego (Rycina 7). Natomiast, wzrost aktywności cAMP/PKA w astrocytach prowadzi do fosforylacji akwaporyny 4 (AQP4), co ostatecznie zwiększa przepuszczalność błony komórkowej dla wody i sprzyja obrzękowi astrocytów [Badaut i wsp., 2011; Song i wsp., 2012; Kitchen i wsp., 2020]. Ponadto, wykazano że astrocytarna AQP4 przyczynia się do propagacji fal depolaryzujących CSD poprzez zwiększenie zewnątrzkomórkowego stężenia  $K^+$  [Yao i wsp., 2014].

Podsumowując: kaskada niedokrwienno/reperfuzyjna składa się z wielu równoległych procesów, w związku z czym skuteczny neuroprotektant powinien wykazywać działanie plejotropowe – hamujące wiele elementów tej kaskady.

### ***1.3. Podstawowe koncepcje leczenia udaru, celowanego w ochronę jednostki nerwowo-naczyniowej***

Biorąc pod uwagę mechanizmy odpowiedzialne za niedokrwienne uszkodzenie mózgu oraz procesy endogenne, które przeciwdziałają ewolucji uszkodzenia związanego z niedokrwieniem, można dokonać charakterystyki teoretycznie skutecznej substancji ochronnej (Rycina 5). Substancję taką należałoby zastosować we wczesnej fazie udaru, kiedy nadal istnieje zdolna do przeżycia strefa półcienia, w celu wsparcia rekrutacji krążenia obocznego. Jednocześnie środek ochronny powinien hamować nadmierną stymulację

neuronów i komórek glejowych poprzez przeciwdziałanie kaskadzie związanej z przeładowaniem tych komórek jonami  $Ca^{2+}$ .



**Rycina 5.** Ognisko niedokrwienia i półcień (penumbra). Wpływ potencjalnego leczenia neuroprotektynowego na czasowo-przestrzenną ewolucję uszkodzenia mózgu w trakcie ogniskowego niedokrwienia i reperfuzji. **Panel A** – nieleczonego udaru mózgu, **panel B** – leczenie neuroprotektynowe, **panel C** – potencjalne cele terapeutyczne w leczeniu niedokrwienia i reperfuzji mózgu (wg Przykaza i Koźniewska, 2022, zmodyfikowano).

Stabilizacja potencjałów błonowych i homeostazy jonowo-wodnej komórek znajdujących się w obszarze niedokrwienia są najważniejszymi celami w tej wczesnej fazie. Substancja taka powinna także zmniejszać stres oksydacyjny/nitrozacyjny oraz wykazywać właściwości przeciwzapalne. Dezaktywacja leukocytów znacznie obniżyłaby poziom stresu wolnorodnikowego w komórkach zapalnych oraz w śródbłonku, poprzez zmniejszenie stężenia cytokin prozapalnych. Wszystkie te działania powinny zwiększyć integralność NVU podczas ostrej fazy udaru niedokrwienego. Idealna substancja ochronna powinna również hamować niekorzystne zjawiska związane z reperfuzją, takie jak PID i aktywacja leukocytów prozapalnych, a w późniejszej fazie reperfuzji, wspierać endogenne procesy naprawcze – takie jak angiogeneza i neurogeneza (Rycina 5 C). Takie działanie plejotropowe mogą wywierać inhibitory wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, do których należą agoniści receptorów Y2R, obecnych powszechnie w rozmaitych strukturach mózgu ssaków.

#### 1.4. Dystrybucja i funkcje receptorów Y2 w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków

Receptor neuropeptydu Y Y2 należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G, klasy A (Rycina 6). Ludzki Y2R składa się z 381 aminokwasów, a jego preferowanymi natywnymi agonistami (nieselektywnymi) są NPY i peptyd YY. Śródbłonkowa proteaza serynowa dipeptydylopeptydaza 4 rozszczepia pełnej długości peptyd NPY(1-36) do



NPY(3-36), który wybiórczo aktywuje receptory Y2 [Abe i wsp., 2007; Robich i wsp., 2010]. Obecnie są dostępne syntetyczne ligandy specyficzne dla Y2R, takie jak C-końcowy fragment NPY – NPY(13-36) oraz inne peptydowe i niepeptydowe związki [Labelle i wsp., 1997; Mittapalli i wsp., 2014]. Gen kodujący Y2R jest zlokalizowany w segmencie chromosomalnym 4q31 u ludzi, a u szczurów i myszy gen dla Y2R znajduje się odpowiednio w segmentach 2q31 i 3 E3 [Ammar i wsp., 1996; Nakamura i wsp., 1996; Lutz i wsp., 1997; Goumain i wsp., 2001]. Ponad 92% sekwencji aminokwasowej Y2R jest podobna u ssaków, co podkreśla znaczenie Y2R w ważnych procesach metabolicznych [Larhammar, 1996].



**Rycina 6.** Trójwymiarowy model wstęgowy ludzkiego receptora Y2. Receptor Y2 jest receptorem sprzężonym z białkiem G, zatem zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego przechodzącego siedmiokrotnie przez błonę komórkową. (Model został zwizualizowany za pomocą programu komputerowego RasTop, na podstawie struktury opublikowanej w internetowym banku struktur białek – PDB, skąd została pobrana. Model teoretyczny, DOI: 10.2210/pdb2IK3/pdb).

Rozmieszczenie i gęstość receptorów Y2 w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) różni się w zależności od struktury anatomicznej. Pośmiertne badania hybrydyzacji *in situ* tkanek ludzkiego mózgu ujawniły wysoki poziom sygnału Y2R-mRNA w neuronach w regionach korowych, regionie CA2 hipokampa, ciele kolankowatym bocznym, jądrze migdałowatym, istocie czarnej, podwzgórzu, mózdzku oraz niski poziom mRNA Y2R w prążkowiu [Caberlotto i wsp., 1998]. Obecność matrycowego RNA w danej strukturze mózgu nie przesądza jednak o obecności w niej czynnego białka receptorowego Y2, ponieważ białko może wędrować włóknem nerwowym do zakończenia nerwowego zlokalizowanego w innej strukturze, stąd ważne jest potwierdzenie obecności białka Y2R. Obecność białka Y2R w mózgu ludzkim potwierdzono badaniami autoradiograficznymi, wykryto je głównie w: hipokampie, jądrze półleżącym, rdzeniu przedłużonym, moście i korze czołowej [Widdowson, 1993]. W mózgu szczura Y2R-mRNA zlokalizowano w hipokampie, podwzgórzu i ciele migdałowatym. W korze mózgowej sygnał występuje na niskim poziomie [Parker i wsp., 1999]. Dane uzyskane z badań autoradiograficznych

wiązania promieniotwórczego liganda Y2R w mózgu szczura dodatkowo potwierdzają wyżej podaną dystrybucję, opartą na identyfikacji transkryptu, natomiast badania funkcjonalne potwierdzają rozmieszczenie receptora Y2 w korowej i podkorowej części mózgu szczura [Shaw i wsp., 2003]. Warto odnotować, że w regionach korowych mózgu człowieka jest znacznie więcej białka Y2 niż w korze mózgowej szczura [Widdowson, 1993], co może mieć znaczenie dla ewentualnych przyszłych badań klinicznych.

Na poziomie synaptycznym białko Y2R można znaleźć zarówno presynaptycznie, jak i postsynaptycznie, ze znaczącą przewagą lokalizacji presynaptycznej [Ghamari-Langroudi i wsp., 2005; Stanić i wsp., 2011].

Poza neuronami, białko receptora Y2R wykryto również w astrocytach mózgu człowieka oraz w neuronach rdzenia kręgowego małpy i szczura [Mantyh i wsp., 1994; Abounader i wsp., 1999].

Z punktu widzenia moich badań, istotna jest obecność Y2R w śródbłonku mózgowych naczyń krwionośnych, co wykazano w badaniu czynnościowym na izolowanych tętnicach środkowych mózgu szczura, w którym zastosowano selektywnego agonistę Y2R [You i wsp., 2001]. Według wyników tego badania, aktywacja Y2R prowadzi do, zależnego od dawki, rozszerzenia naczyń krwionośnych. W reakcji tej pośredniczy śródbłonkowy tlenek azotu (NO), wywołujący hamowanie skurczu komórek mięśni gładkich naczyń.

Y2R bierze udział w modulacji wielu procesów fizjologicznych w OUN, takich jak reakcje na stres i reakcje emocjonalne, rytmy okołodobowe, procesy pamięciowe, regulacja apetytu i ciśnienia krwi [Hökfelt i wsp., 1998; Reichmann i wsp., 2016]. Główną funkcją Y2R we wszystkich tych procesach jest hamowanie uwalniania neuroprzekazników z zakończeń presynaptycznych, m.in. hamowanie wydzielania pobudzającego kwasu glutaminowego [Brothers i wsp., 2010; Tasan i wsp., 2016]. Ta obserwacja stała się podstawą do podjęcia badań potencjału neuroprotekcyjnego neuropeptydu Y i jego analogów, które selektywnie aktywują Y2R.

### ***1.5. Potencjał neuroprotekcyjny pobudzenia receptorów Y2***

Aktywacja receptora Y2R skutkuje zahamowaniem aktywności cykazy adenylowej oraz obniżeniem wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznego adenozyńmonofosforanu i związanej z nim aktywności kinazy białkowej A, co ostatecznie przyczynia się do zmniejszenia prawdopodobieństwa pobudzenia neuronów.



wpływem aktywacji Y2R dostarczają wyniki badań prowadzonych *in vitro* i *in vivo* w modelu ekscytotoksyczności wywołanej podaniem kwasu kainowego do hodowli pierwotnej neuronów korowych i hipokampalnych myszy jak również po iniekcji tego kwasu do hipokampa szczura [Śmiałowska i wsp., 2009]. W tych badaniach w obu przypadkach wykazano neuroprotekcję po podaniu NPY(13-36). Brak natomiast danych o wpływie pobudzenia tych receptorów na przebieg PID. Jednakże, Woldbye i wsp. (2010) w badaniach *in vivo* zaobserwowali, że u szczurów ze zwiększoną ekspresją Y2R w hipokampie znacznie trudniej jest uzyskać pobudzenie wyładowań po podaniu kwasu kainowego oraz w modelu rozniecienia (ang. *Kindling*). Hamowanie ekscytotoksyczności po pobudzeniu Y2R obserwowano również w badaniach *in vitro* na materiale pobranym od pacjentów cierpiących na padaczkę lekooporną [Ledri i wsp., 2015; Wickham i wsp., 2019].

W kontekście ochrony jednostki nerwowo-naczyniowej, na uwagę zasługują opublikowane ostatnio wyniki badań Lee i wsp. (2022) wskazujące na poprawę mikrokrążenia mózgowego po dożylnym podaniu agonisty Y2R – PYY(3-36) w modelu globalnego niedokrwienia mózgu u szczurów SD.

W świetle aktualnej, zgromadzonej na przestrzeni ostatnich kilkadziesiąt lat, wiedzy o występowaniu, funkcjach fizjologicznych i działaniach ochronnych pobudzenia receptorów NPY na komórki nerwowe, agoniści Y2R wydają się posiadać największy potencjał neuroprotekcyny. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że pobudzenie Y1R i Y5R nie wykazuje potencjału ochronnego ani w modelu ekscytotoksyczności ani w doświadczalnym niedokrwienia mózgu [Śmiałowska i wsp., 2009; Domin i wsp., 2017]. Przytoczone w niniejszym wstępie dane dotyczące możliwości wielokierunkowego hamowania niekorzystnych procesów zachodzących w trakcie udaru niedokrwiennego/reperfuzji mózgu przez pobudzenie receptorów Y2 stały się inspiracją do podjęcia badań stanowiących temat niniejszej rozprawy.

## 2. CEL BADAŃ

**Celem badań** była ocena neuroprotekcynowego działania specyficznego agonisty receptora Y2 – C-końcowego fragmentu cząsteczki neuropeptydu Y – NPY(13-36) oraz ocena jego wpływu na poniedokrwienne uszkodzenie naczyń mikrokrążenia w strefie penumbry, w modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu z reperfuzją u szczurów normotensyjnych *Sprague-Dawley* (SD) i szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR, ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*).

**Cele szczegółowe badań** obejmowały określenie wpływu NPY(13-36), podanego do komory bocznej mózgu 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji na:

- 1) wielkość obszaru mózgu uszkodzonego niedokrwieniem;
- 2) wybrane parametry chodu i spontaniczną aktywność ruchową;
- 3) odpowiedź mikroprzepływu krwi w strefie półcienia ischemicznego na wzrost ciśnienia parcjalnego CO<sub>2</sub> we krwi tętniczej i na podanie inhibitora syntazy tlenu azotu;
- 4) gęstość naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej w strefie okołozawałowej;
- 5) szczelność bariery krew-mózg w korze mózgowej w strefie okołozawałowej.

### 3. MATERIAŁY I METODY

Na przeprowadzenie badań otrzymano zgody IV oraz I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach Doświadczalnych w Warszawie (odpowiednio: zezwolenia nr 99/2012 oraz 297/2017). Badania zaplanowano i przeprowadzono zgodnie z zaleceniami międzynarodowych konsorcjów, powołanych w celu opracowania standaryzowanych protokołów badań doświadczalnych nad neuroprotekcją mózgu i zwiększenia potencjału translacyjnego wyników badań podstawowych w udarze niedokrwiennym mózgu [Dirnagl, 2006].

#### 3.1. Zwierzęta eksperymentalne

Do badań użyto 67 samców szczurów (*Rattus norvegicus*) szczepu SD, o masie ciała 270 – 320 g oraz 62 samców szczurów szczepu SHR, o masie ciała 280 – 340 g, w wieku 3 – 4 miesięcy. Szczury obu szczepów pochodziły z hodowli Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Zwierzęta utrzymywane były w otwartych klatkach z wolnym dostępem do pokarmu (standardowej paszy dla szczurów) i wody.

*Tabela 1. Opis grup kontrolnych i eksperymentalnych.*

Nazwa grupy	Opis grupy
<b>Grupa SHAM</b>	Grupa szczurów poddana procedurze pozorowanego, 90-minutowego zamknięcia światła (okluzji) prawej tętnicy środkowej mózgu (MCA) z wprowadzeniem igły iniekcyjnej do prawej komory bocznej mózgu 30 minut po wywołaniu pozorowanej okluzji lub 30 minut po przeprowadzeniu pozorowanej reperfuzji.
<b>MCAOR/sól fizjologiczna (grupa kontrolna)</b>	Grupa kontrolna – szczury z 90-minutową okluzją i 24- lub 72-godziną reperfuzją prawej MCA, z podaniem 6 µl soli fizjologicznej do prawej komory bocznej mózgu 30 minut po rozpoczęciu okluzji lub 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji – oba warianty były pulowane, co zminimalizowało liczbę szczurów użytych do badań.
<b>NPY(13-36) w trakcie ischemii</b>	Grupa eksperymentalna I – szczury z 90-minutową okluzją i 24 lub 72-godziną reperfuzją prawej MCA, z podaniem 10 µg NPY(13-36) w 6 µl soli fizjologicznej do prawej komory bocznej mózgu 30 minut po rozpoczęciu okluzji.
<b>NPY(13-36) w trakcie reperfuzji</b>	Grupa eksperymentalna II – szczury z 90-minutową okluzją i 24 lub 72-godziną reperfuzją prawej MCA, z podaniem 10 µg NPY(13-36) w 6 µl soli fizjologicznej do prawej komory bocznej mózgu 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji.

MCA – tętnica środkowa mózgu (ang. *Middle cerebral artery*); MCAOR – zamknięcie światła MCA z reperfuzją (ang. *Middle cerebral artery occlusion with reperfusion*)

Ciśnienie tętnicze (mierzone u czuwających zwierząt metodą pletyzmograficzną na ogonie) wynosiło u szczurów szczepu SD: skurczowe –  $145 \pm 8$  mmHg, rozkurczowe –  $105 \pm 6$  mmHg, a u szczurów szczepu SHR odpowiednio  $177 \pm 3$  mmHg i  $124 \pm 4$  mmHg. Wyliczone z tych wartości średnie ciśnienie tętnicze wynosiło  $118 \pm 3$  mmHg u szczurów szczepu SD i  $142 \pm 4$  mmHg u szczurów szczepu SHR.

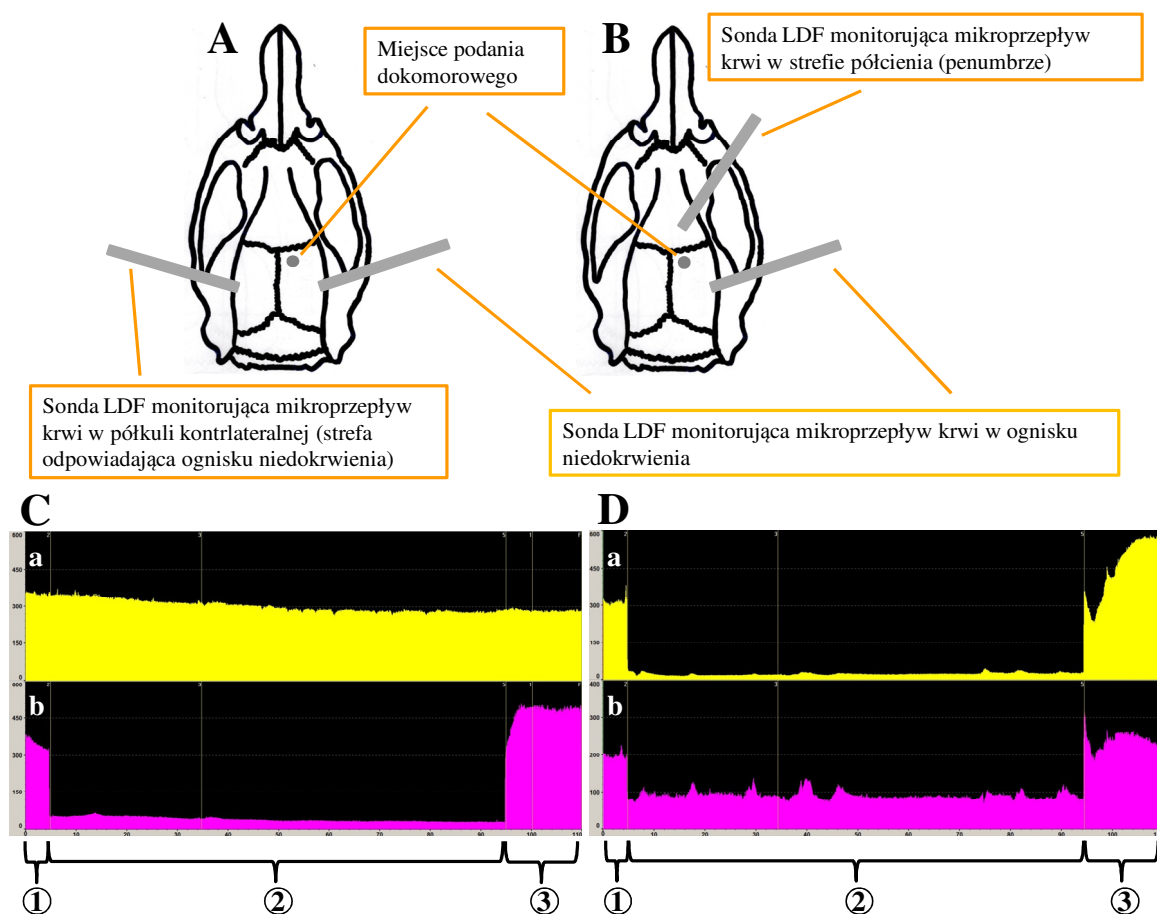
Pula szczurów w każdym ze szczepów została losowo przydzielona do jednej z 4 grup, scharakteryzowanych w Tabeli 1. Szczegółowe licznosci szczurów w grupach zostały podane w opisach tabel, w tabelach lub w opisach rycin, w rozdziale „Wyniki”.

### **3.2. Ogniskowe niedokrwienie mózgu z reperfuzją**

W celu wywołania czasowego zamknięcia światła prawej tętnicy środkowej mózgu (MCAOR; ang. *Middle cerebral artery occlusion with reperfusion*), szczury były wstępnie zwiotczone mieszaniną podtlenku azotu i izofluranu (narkoza wziewna: 70%N<sub>2</sub>O/30%O<sub>2</sub>/5% izofluran) i intubowane przez jamę ustną. Podczas preparatyki niezbędnej do wywołania niedokrwienia mózgu jak również podczas niedokrwienia, szczury utrzymywano w anestezji wziewnej (70%N<sub>2</sub>O/30%O<sub>2</sub>/2-2,5% izofluran) przy użyciu respiratora dla małych zwierząt. Temperaturę ciała zwierzęcia utrzymywano termostatycznie w granicach  $\sim 37^{\circ}\text{C}$ .

Istotnym elementem doświadczenia był pomiar mikroprzepływu krwi w korze mózgowej (LDF, ang. *Laser-Doppler flow*). W celu przygotowania miejsc monitorowania LDF, zwierzę było umieszczane w pozycji leżącej na brzuchu, a jego głowa mocowana w uchwycie stolika stereotaktycznego. Po przecięciu skóry na głowie wzdłuż szwu strzałkowego, odsłaniano sklepienie czaszki. W sklepieniu czaszki, symetrycznie po stronie prawej i lewej, wykonano za pomocą wiertła dentystycznego wgłębienia o średnicy 1,5 mm, umiejscowione 8 mm z boku i 1 mm z tyłu od Bregmy. Czaszkę, podczas wiercenia tych wgłębień, schładzano solą fizjologiczną o temperaturze pokojowej. Ta procedura pozwalała na pocienienie kości czaszki w celu uwidocznienia naczyń krwionośnych powierzchni mózgu. W celu monitorowania niedokrwienia i wczesnej reperfuzji mózgu, w tych wgłębieniach umieszczano sondy laserowego przepływomierza Dopplerowskiego (DRT4, Moor Instruments Ltd., needel probe DP3 80 mm) do pomiaru mózgowego lokalnego mikroprzepływu krwi (Rycina 8 A i C). Wyniki pomiarów LDF wyrażano w jednostkach niemianowanych (AU, ang. *Arbitral units*). W przypadku przygotowania do badań reaktywności mikrokrążenia mózgowego 24 godziny po reperfuzji mózgu, zagłębienia wiercono po prawej stronie

sklepienia czaszki w rejonach odpowiadających ognisku niedokrwienia i strefie półcienia (Rycina 8 B i D), zgodnie z danymi opublikowanymi przez Cipolla i wsp., 2018b.



**Rycina 8. Panele A i B** – schemat miejsc pomiaru LDF podczas niedokrwienia i wczesnej reperfuzji w dwóch wariantach doświadczenia. W części A – sondy umieszczano symetrycznie, w ognisku niedokrwienia w półkuli ipsilateralnej i w odpowiadającym mu topograficznie miejscu w półkuli kontralateralnej; w części B – obie sondy umieszczano w półkuli niedokrwionej, jedną w ognisku niedokrwienia, drugą w strefie penumbry. Zaznaczono również miejsce dokomorowego podania substancji; **panele C i D** przedstawiają przykładowe zapisy LDF. W części C przedstawiono zapisy LDF w półkuli niedokrwionej (Cb) i kontralateralnej (Ca). Obustronny zapis umożliwił jednoznaczne wykluczenie przypadkowego wywołania krwotoku podpajęczynówkowego, w wyniku którego dochodzi do porównywalnego spadku LDF w obu półkulach mózgu; w części D przedstawiono zapisy LDF w ognisku niedokrwienia (Da, obniżenie LDF o około 80%) i w obszarze penumbry (Db, obniżenie LDF o około 50%). 1 – LDF wyjściowy, 2 – LDF w trakcie niedokrwienia, 3 – LDF w trakcie wczesnej reperfuzji.

W celu wprowadzenia do tętnicy szyjnej zewnętrznej kaniuli oraz filamentem, umożliwiającym wewnątrznaczyniowe zamknięcie światła prawej tętnicy środkowej mózgu, zwierzę układano na grzbiecie, przecinano skórę szyi, preparowano prawe tętnice szyjne: wspólną, zewnętrzną i odcinek tętnicy wewnętrznej, najbliższy zatoki szyjnej. Podwiązywano odchodzącą od tej ostatniej tętnicę skrzydłowo-podniebienną. Tętnica szyjna zewnętrzna była



wstecznie kaniulowana cewnikiem PE90, przez który wprowadzono nić polietylenową 3,0 zakończoną silikonową kulką o średnicy 3,7  $\mu\text{m}$  (4037Pk10; Doccol Co., Redlands, CA, U.S.A.). Procedura zamknięcia tętnicy środkowej mózgu oraz przebieg niedokrwienia były monitorowane za pomocą pomiaru LDF. Sondy pomiarowe były umieszczone zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 8 A i C.

W celu wywołania niedokrwienia, nić wsuwano do momentu wyczucia oporu (około 17 mm powyżej zatoki szyjnej) i zmniejszenia sygnału LDF w rejonie ogniska niedokrwienia po tej samej stronie do około 20% wartości wyjściowej. Po upływie 90 minut nić wycofywano do poziomu zatoki szyjnej umożliwiając reperfuzję. NPY(13-36) (10  $\mu\text{g}$  w objętości 6  $\mu\text{l}$  soli fizjologicznej) lub sól fizjologiczna w grupie kontrolnej (6  $\mu\text{l}$ ) były podawane do prawej komory bocznej mózgu 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji. Wymienione substancje wprowadzano przez kaniulę 23G, zaopatrzoną w igłę z ogranicznikiem i połączoną ze strzykawką Hamiltona. Nakłucie wykonano na głębokość 5 mm, 1,5 mm na prawo od Bregmy i 0,5 mm do tyłu od szwu wieńcowego (w miejscu tym w trakcie preparatyki sklepienia czaszki wykonano pocienienie o średnicy ok. 1 mm).

W celu wywołania niedokrwienia pozorowanego (grupa SHAM), nić wsuwano do tętnicy szyjnej wewnętrznej na odległość 3-5 mm powyżej zatoki szyjnej. Po upływie 90 minut, nić wycofywano do poziomu zatoki szyjnej, podobnie jak w przypadku niedokrwienia faktycznego. W tej grupie zwierząt, do prawej komory bocznej mózgu w odpowiednich momentach wbijano igłę iniekcyjną.

### **3.3. Ocena wielkości uszkodzenia mózgu**

Po ukończeniu testów behawioralnych część zwierząt była dekapitowana, a ich mózgi wypreparowywane, umieszczane w matrycy ZIVIC Labs do cięcia w płaszczyźnie czołowej i cięte na skrawki o grubości 2 mm. Wielkość podarowego uszkodzenia mózgu oceniana była za pomocą barwienia skrawków mózgowych chlorkiem 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowym (TTC, 2,5% roztwór w buforze fosforanowym) przez 10 minut w temperaturze 37°C [Bedersoni *wsp.*, 1986]. Wybarwione skrawki były utrwalane w 10% roztworze formaliny przez co najmniej 24 godziny przed analizą morfometryczną pola uszkodzenia, z uwzględnieniem poprawki na obrzęk mózgu [Swanson *i wsp.*, 1990]. Obszar uszkodzenia dla każdego skrawka wyliczano w procentach pola powierzchni półkuli nieuszkodzonej korzystając z równania:  $\text{obszar uszkodzenia} = [(\text{pole powierzchni półkuli kontralateralnej} - \text{pole powierzchni części}$

nuszkodzonej półkuli ipsilateralnej)/pole powierzchni półkuli kontralateralnej]. Objętość uszkodzenia mózgu otrzymywano sumując pola powierzchni uszkodzenia pojedynczych skrawków.

### 3.4. Testy behawioralne

Testy behawioralne (obejmujące ocenę chodu po bieżni poziomej i aktywność ruchową w otwartym polu), były wykonywane w przeddzień okluzji tętnicy MCA (rejestracja kontrolna) oraz po 72 godzinach od momentu reperfuzji. Testy prowadzono przy pomocy urządzenia do automatycznej/cyfrowej rejestracji chodu gryzoni (CatWalk 7.1, Noldus, Holandia) oraz areny otwartego pola (Stoelting, U.S.A). W ciągu czterech dni poprzedzających rejestrację kontrolną szczury były przyzwyczajane do eksperymentatora i do warunków panujących w laboratorium oraz wstępnie trenowane do przebiegów po bieżni CatWalk. Surowe dane uzyskane z testów CatWalk i otwartego pola zostały wstępnie skwantyfikowane przy użyciu oprogramowania komputerowego, odpowiednio: CatWalk 7.1 i EthoVision XT 10.

#### 3.4.1. Ocena parametrów chodu w teście CatWalk

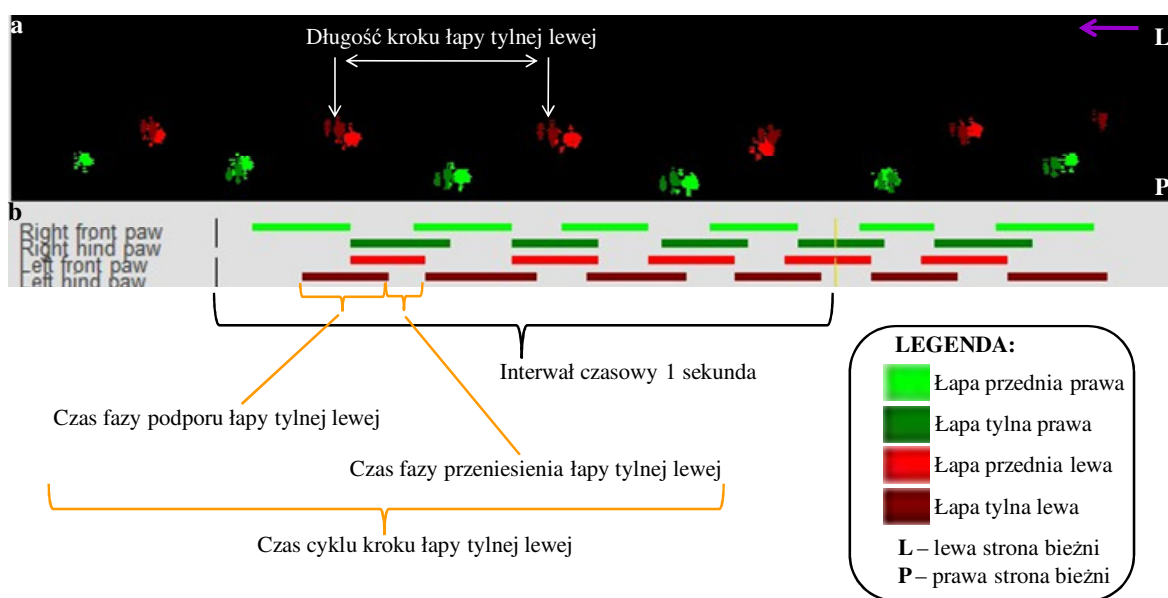
Testy CatWalk przeprowadzano w zaciemnionym laboratorium badań behawioralnych.

**Tabela 2.** Objasnienie parametrów chodu mierzonych w teście CatWalk.

Parametr chodu	Opis parametru
<i>Parametry czasowe</i>	
<b>Czas przebiegu [s]</b>	Całkowity czas przebiegu szczura na bieżni
<b>Średnia prędkość przebiegu [cm/s]</b>	Średnia prędkość z jaką zwierzę przebiegło bieżnię
<b>Czas cyklu kroku [s]</b>	Czas pomiędzy dwoma kolejnymi, inicjującymi kontaktami tej samej łapy z bieżnią (czas podparcia łapą + czas przeniesienia łapy)
<b>Czas podparcia [s]</b>	Czas kontaktu łapy z bieżnią
<b>Czas przeniesienia [s]</b>	Czas braku kontaktu łapy z bieżnią w czasie jej przenoszenia
<b>Prędkość przeniesienia [pix./s]</b>	Prędkość z jaką łapa jest przenoszona (długość kroku / czas przeniesienia łapy)
<b>Współczynnik podparcia [%]</b>	Czas podparcia wyrażony jako procent czasu cyklu kroku (czas podparcia/(czas podparcia + czas przeniesienia) * 100%)
<i>Parametry przestrzenne</i>	
<b>Długość kroku [pix.]</b>	Odległość między kolejnymi śladami tej samej łapy
<b>Powierzchnia śladu [pix.<sup>2</sup>]</b>	Powierzchnia całego śladu łapy
<b>Rozstaw kończyn [pix.]</b>	Szerokość odstepu pomiędzy obiema przednimi lub tylnymi łapami

*pix.* – piksele

Urządzenie CatWalk jest wykonane z pleksiglasowej, prostokątnej płyty (bieżni) o długości 130 cm, ustawionej równolegle do podłogi pomieszczenia, z podłączoną świetlówką wzdłuż jednej z dłuższych krawędzi bieżni. Zielone promienie świetlne wysyłane na bieżnię są niemal całkowicie rozpraszane. Gdy powierzchnia wewnętrzna łapy zwierzęcia jest w kontakcie z górną powierzchnią bieżni, światło jest odbijane od łapy w dół.



**Rycina 9.** Objaśnienie graficznego wyniku z testu CatWalk. Wynik parametryzacji przebiegu zwierzęcia w teście CatWalk jest przedstawiany w formie wartości liczbowych oraz w postaci obrazu (jak wyżej). W **panelu a** widoczne są ślady łap szczura (parametry przestrzenne); w **panelu b** pokazano parametry czasowe, długość kolorowych prostokątów (znaczenie kolorów objaśnione w legendzie) i poziomych przerw między nimi reprezentuje odpowiednio czas fazy podporu łapą i czas fazy jej przenoszenia; interwał czasowy 1 s jest przedstawiony jako odstęp pomiędzy pionowymi, przerywanymi liniami. W **panelu a**, fioletowa strzałka oznacza kierunek i zwrot przebiegu szczura, w **panelu b** ten sam przebieg ukazany jest od lewej strony do prawej. Parametry chodu objaśniono dla łapy tylnej lewej.

Powstaje w ten sposób obraz jasnego odcisku łapy na spodniej stronie bieżni w czasie kontaktu łapa-bieżnia. Cały przebieg chodu szczura jest rejestrowany za pomocą kamery umieszczonej na stałe pod bieżnią i podłączonej do komputerowej stacji akwizycji danych. W polu widzenia kamery znajduje się jednocześnie całość bieżni [Hamers i wsp., 2001; Encarnacion i wsp., 2011]. Aby zwiększyć motywację szczurów do przebiegnięcia po bieżni bez zatrzymywania się, wykorzystano dźwięk ręcznego dzwonka – sygnał do rozpoczęcia biegu, oraz domek przypominający norę (stanowiący bezpieczne schronienie dla zwierząt) umieszczony na końcu bieżni. W pamięci komputera zapisywano 8 nieprzerwanych przebiegów od każdego zwierzęcia zarówno w dniu przed, jak i 72 godziny po reperfuzyjii.

Parametry chodu, które uzyskano z każdego przebiegu (Tabela 2, Rycina 9), obejmowały: a) parametry czasowe (średni czas przebiegu, średnia prędkość przebiegu, czas cyklu kroku, czas podparcia łapy, czas przeniesienia łapy, prędkość przeniesienia łapy, współczynnik podparcia); b) parametry przestrzenne (długość kroku, powierzchnia śladu, długość śladu, szerokość śladu, rozstaw kończyn przednich i tylnych). Parametry czasowe wyrażono odpowiednio w sekundach [s] i pikselach na sekundę [pix./s] z wyjątkiem współczynnika podparcia wyrażonego w procentach [%]. Współczynnik ten określa jaką część całego cyklu kroku stanowi faza, w której kończy się kontakt z podłożem; parametry przestrzenne wyrażono w pikselach [pix.] i pikselach kwadratowych (powierzchnia) [pix.<sup>2</sup>].

### **3.4.2. Ocena aktywności ruchowej w teście otwartego pola**

Test otwartego pola był przeprowadzany bezpośrednio po ukończeniu testu CatWalk. Do jego wykonania używano kwadratowej areny (Stoelting, USA) (100 × 100 cm) otoczonej nieprzezroczystymi ściankami o wysokości 35 cm. Test rozpoczynano od umieszczenia szczura w centrum areny, a następnie, w sposób ciągły, za pomocą kamery umieszczonej nad areną, rejestrowano spontaniczną aktywność ruchową zwierzęcia przez 10 minut. Analizowano następujące parametry: całkowita przebyta droga [cm], czas poruszania się [s], prędkość chodu [cm/s].

### **3.5. Ocena zaburzeń regulacji mikrokrążenia krwi w strefie półcienia ischemicznego**

Po 24 godzinach od reperfuzji zwierzęta były ponownie znieczulane ogólnie (mieszanina 70% N<sub>2</sub>O/30% O<sub>2</sub> zawierająca 5% izofluranu), intubowane przez jamę ustną, podłączone do respiratora dla gryzoni (UGO Basile 7025) i wentylowane mieszaniną 70% N<sub>2</sub>O/30% O<sub>2</sub> zawierającą 2-2,5% izofluranu. Zaintubowane zwierzę umieszczano na termostатовanej podkładce grzewczej. W pozycji leżącej na grzbiecie preparowano prawą i lewą tętnicę udową oraz prawą żyłę udową. Do każdego z tych naczyń wprowadzano kaniule PE50 (każda wypełniona 0,03 ml 5000 j/mł heparyny w 1 ml roztworu soli fizjologicznej).

Następnie zwierzę układano w pozycji na brzuchu, z głową unieruchomioną w ramce stereotaktycznej. W kości czaszki półkuli niedokrwionej, w obszarach odpowiadających ognisku niedokrwienia i penumbry oczyszczano zagłębienia wywiercone poprzedniego dnia, a następnie umieszczono w nich sondy do pomiaru LDF. Średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP, ang. *Mean arterial blood pressure*) było mierzone metodą bezpośrednią, za pomocą

manometru piezoelektrycznego poprzez kaniulę wprowadzoną do światła lewej tętnicy udowej. Monitor LDF oraz manometr połączone były z komputerem, za pomocą którego zbierano i częściowo analizowano uzyskane dane.

Oceniano odpowiedzi mikrokrążenia na hiperkapnię (regulacja chemiczna) oraz zablokowanie syntezy tlenu azotu (regulacja podstawowego napięcia naczyń zależna od tlenu azotu).

Do badania regulacji chemicznej zastosowano bodziec w postaci 5% CO<sub>2</sub> dodawanego do mieszaniny gazów oddechowych na okres 6 minut. Harmonogram doświadczenia był następujący: 2 minuty zapisu LDF podczas wentylacji w normokapnii, 6 minut zapisu LDF podczas wentylacji 5% CO<sub>2</sub> i 15 minut zapisu LDF po powrocie do wentylacji normokapnicznej. Poziom CO<sub>2</sub> we krwi tętniczej oznaczano w próbkach krwi (~0,2 ml) pobieranych 2 minuty przed podaniem 5% CO<sub>2</sub>, w 6 minucie od rozpoczęcia wentylacji 5% CO<sub>2</sub> i 15 min po powrocie do wentylacji normokapnicznej. Po 30 minutach stabilizacji mikroprzepływu krwi w normokapnii był przeprowadzany test funkcji śródbłonna poprzez ocenę odpowiedzi na zablokowanie aktywności syntazy tlenu azotu za pomocą metyloowanej pochodnej L-argininy (30 mg / kg L-NAME w 0,3 ml roztworu soli fizjologicznej) podanej do żyły udowej. Zapis LDF kontynuowano do 30 minut po podaniu L-NAME. Zwierzę uśmiercano natychmiast po zakończeniu testu z L-NAME.

Ze względu na zmiany ciśnienia tętniczego krwi towarzyszące hiperkapnii (w mniejszym stopniu) oraz podaniu L-NAME (wzrost MABP > 50%), odpowiedzi mikrokrążenia nie można było analizować w oparciu o zmianę LDF. Aby uniezależnić reakcję LDF od zmian ciśnienia tętniczego posłużono się indeksem oporu naczyniowego CVRI (ang. *Index of cerebrovascular resistance*), używanego jako wskaźnik oporu naczyniowego w mikrokrążeniu:

$$CVRI = MABP/LDF.$$

W oparciu o zmiany procentowe CVRI ( $\Delta\%CVRI$ ) oceniano odpowiedź mikrokrążenia na podanie L-NAME. Natomiast odpowiedź na hiperkapnię, oceniano za pomocą indeksu chemicznego CI (ang. *Chemical vasomotor reactivity index*) definiowanego jako  $\Delta\%CVRI$  przypadająca na 1 mmHg wzrostu pCO<sub>2</sub> ( $\Delta pCO_2$  – różnica pCO<sub>2</sub> między 6 minutą inhalacji 5% CO<sub>2</sub> a 2 minutą tuż przed rozpoczęciem tej inhalacji):

$$CI = \Delta\%CVRI/\Delta pCO_2.$$

### **3.6. Pobranie tkanek mózgu do badań immunofluorescencyjnych**

Siedemdziesiąt dwie godziny od momentu reperfuzji zwierzęta w narkozie były perfundowane przezsercowo solą fizjologiczną o temperaturze 4°C, a następnie 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w PBS. Po wyjęciu z czaszki, mózgi utrwalano dodatkowo przez 2 godziny w 4% PFA i przeprowadzano przez krioprotekcję z użyciem 20% sacharozy, a następnie zamrażano w temperaturze -80°C. Mózgi były krojone na skrawki o grubości 60 µm w kriostacie w temperaturze -20°C (Leica, Wetzlar, Niemcy) i przechowywane w *antifreeze water* w temperaturze -20°C do czasu barwienia.

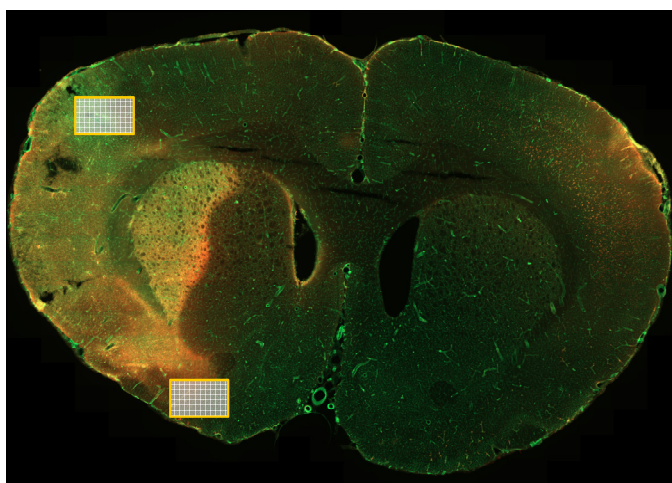
#### **3.6.1. Ocena gęstości i szczelności naczyń mikrokrążenia**

Po wyjęciu z *antifreeze water*, skrawki przepłukiwano 3-krotnie roztworem PBS. Następnie inkubowano przez 1 godzinę w mieszaninie permeabilizująco-blokującej składającej się z PBS z dodatkiem 0,5% Tritonu X-100, 10% normalnej surowicy koziej (NGS, ang. *Normal goat serum*) oraz 1% albuminy z surowicy bydlęcej (BSA, ang. *Bovine serum albumin*).

Skrawki wybarwiono specyficznymi przeciwciałami. W celu detekcji naczyń krwionośnych użyto mysich przeciwciał, skierowanych przeciw markerowi specyficznemu dla komórek endotelium (*mouse anti-RECA-1*, ang. *Rat endothelium cells antigen-1*; w rozcieńczeniu 1:200; firmy Serotec). Szczelność bariery krew-mózg oceniano poprzez detekcję wycieków surowicy z uszkodzonych mikronaczyń mózgowych przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko szczerzym, natywnym immunoglobulinom klasy IgG (*goat anti-rat IgG*, skoniugowane z Cy3; 1:500; Invitrogen). Skrawki były inkubowane z tymi przeciwciałami 12 godzin w temperaturze 4°C, a następnie inkubowane 1 godzinę w temperaturze 22°C z przeciwciałem drugorzędowym, skoniugowanym z cząsteczką fluorochromu (Alexa Fluor 488, *goat anti-mouse IgG1*; 1:500; Invitrogen).

Wybarwione skrawki po przeniesieniu na szkiełka podstawowe skanowano (cały skrawek) za pomocą laserowego mikroskopu konfokalnego AxioObserver Z.1, uzyskiwane w ten sposób obrazy mikroskopowe zapisywano w pamięci zewnętrznego dysku twardego. Barwienie przeprowadzano jednocześnie na skrawkach pobieranych z każdej z grup wymienionych w Tabeli 1, przy czym do analizy ilościowej (gęstość najmniejszych naczyń mikrokrążenia oraz szczelność bariery krew-mózg) pobierano po 1 skrawku mózgu (lokalizacja ok. 2,20 mm w przód od Bregmy; wg Paxinos i wsp., 1986) z każdego szczura z danej grupy. W celu kwantyfikacji gęstości i szczelności najmniejszych naczyń

(średnica  $\leq 20 \mu\text{m}$ ), ze skanu całego skrawka wybierano po 2 fragmenty z kory mózgowej części grzbietowej i brzusznej (w przybliżeniu okolice kory czołowej i ciemieniowej oraz kory wyspowej; Rycina 10). U szczurów z grup MCAOR każdy z wybranych fragmentów obejmował w połowie miejsce uszkodzenia poniedokrwiennego oraz w połowie miejsce tuż przy tym uszkodzeniu. Uszkodzenie poniedokrwienne lokalizowano na skrawku na podstawie identyfikacji zaburzonej struktury naczyniowej (barwienie RECA-1, Rycina 10). U szczurów z grup SHAM, wybrane fragmenty skrawków pochodziły z takiej samej lokalizacji anatomicznej jak u szczurów z niedokrwieniem.



**Rycina 10.** Zdjęcie mikroskopowe skrawka mózgu szczura SHR o grubości  $60 \mu\text{m}$  z zaznaczonymi fragmentami (prostokątne ramki), które wybierano do dalszej analizy. Skrawek wybarwiony immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciała pierwszorzędowego, skierowanego przeciwko markerowi komórek endotelium RECA-1 wraz z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym (zielony) oraz przeciwciała drugorzędowego anti-rat IgG (czerwony), skierowanego przeciw natywnym immunoglobulinom osocza.

W celu kwantyfikacji gęstości naczyń obrazy te poddano analizie skeletonizacji w programie AngioTool [E. Zudaire i wsp., 2011]. Gęstość mikronaczyń wyrażano wystandaryzowaną miarą – jako procent powierzchni wycinka (wielkość 8 430 631 pikseli) zajmowany przez najmniejsze naczynia krwionośne (ang. *Vessels percentage area*). Uzyskane w ten sposób dane z 2 fragmentów kory mózgowej były w pierwszej kolejności uśredniane dla szczura/skawka a ostatecznie dla grupy.

Miejsca rozszczelnienia BBB rozpoznawano wzrokowo, na podstawie identyfikacji kolokalizacji przeciwciała drugorzędowego *goat anti-rat IgG* z markerem naczyń krwionośnych (RECA-1). Analizowano naczynia o średnicy nie większej niż  $20 \mu\text{m}$  w polu 2 wycinków o wielkości 7 166 524 pikseli każdy. Miejsca rozszczelnienia BBB zliczano ręcznie, a uzyskane dane wpisywano do arkusza kalkulacyjnego Excel 2007 i w celu standaryzacji danych wyrażono ostatecznie w stosunku do gęstości mikronaczyń w rozpatrywanym regionie skrawka. Uzyskane w ten sposób dane z 2 fragmentów kory mózgowej były w pierwszej kolejności uśredniane dla szczura/skawka a ostatecznie dla grupy. Stopień przeciekania mikronaczyń wyrażono w postaci wskaźnika szczelności mikronaczyń (MLI, ang. *Microvessel leakage index*), obliczanego jako stosunek liczby miejsc

przeciekania ( $N_L$ ) do gęstości naczyń o średnicy  $\leq 20 \mu\text{m}$  ( $D_M$ ) w analizowanym fragmencie kory mózgowej ( $MLI = N_L / D_M$ ).

### 3.7. Punkty czasowe, w których przeprowadzono badania wpływu podania NPY(13-36)

W Tabeli 3 przedstawiono opis badań prowadzonych w poszczególnych punktach czasowych doświadczeń, w których prowadzono pomiary parametrów oceniających potencjał ochronny NPY(13-36).

**Tabela 3.** Charakterystyki punktów czasowych i przeprowadzonych pomiarów.

Punkt czasowy	Opis badań prowadzonych w punkcie czasowym
85 minuta niedokrwienia mózgu	Pięć minut przed reperfuzyją MCA, zmierzono poziom LDF w strefie półcienia i odniesiono go do LDF zmierzonego w 5 minucie po rozpoczęciu niedokrwienia, w ten sposób możliwa była ocena potencjalnego wpływu NPY(13-36) podanego w czasie niedokrwienia na rekrutację krążenia obocznego do strefy półcienia.
24 godziny po reperfuzyji faktycznej lub pozorowanej SHAM	Badano reaktywność mikrokrążenia mózgowego na hiperkapnię i zablokowanie syntezy NO; oceniano masę ciała szczurów w odniesieniu do masy wyjściowej.
72 godziny po reperfuzyji faktycznej lub pozorowanej SHAM	Po 72 godzinach od momentu reperfuzyji MCA obszar uszkodzenia mózgu osiąga maksymalną wielkość. W tym punkcie czasowym: zmierzono wielkość uszkodzenia mózgu (martwicy); przeprowadzono testy behawioralne; zbadano gęstość naczyń mikrokrążenia oraz stopień rozszczelnienia BBB; oceniano masę ciała szczurów w odniesieniu do masy wyjściowej.

### 3.8. Analiza statystyczna danych

Analizy statystyczne, za wyjątkiem metaanaliz, przeprowadzono z użyciem programu Statistica (StatSoft). Rozkład normalny zmiennych umożliwił zastosowanie testów parametrycznych. Wartości liczbowe podane są w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  błąd standardowy (SEM, ang. *Standard error of the mean*).

#### 3.8.1. Analiza zmian mikroprzepływu w korze mózgowej w czasie niedokrwienia i reperfuzyji mózgu oraz analiza wielkości poischemicznego uszkodzenia mózgu

Analizę statystyczną różnic wielkości uszkodzenia mózgu przeprowadzono przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu porównań wielokrotnych Dunett'a. Zmiany LDF w trakcie niedokrwienia/reperfuzyji analizowano wielowymiarową analizą wariancji (MANOVA) i testem  $T^2$  Hotteling'a.

Porównanie wpływu ogniskowego niedokrwienia mózgu i reperfuzyji na wielkość uszkodzenia mózgu u szczurów normotensyjnych SD i szczurów z nadciśnieniem tętniczym



SHR (porównanie pomiędzy grupami kontrolnymi obu szczepów) przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta dla pomiarów niezależnych, dodatkowo określono miarę wielkości efektu – współczynnik  $d$  Cohen'a. W celu szacunkowego porównania wpływu podania NPY(13-36) u obu badanych szczepów szczurów oraz wpływu punktu czasowego podania NPY(13-36) na wielkość uszkodzenia mózgu zastosowano metodę metaanalizy, w której jako miarę efektu zastosowano standaryzowaną wielkość efektu – SMD (standaryzowana różnica średnich, ang. *Standardized mean difference*). Metaanalizę, wraz z wykresem (ang. *Forest plot*) przeprowadzono przy użyciu oprogramowania RevMan 5.3 (Review Manager 5.3, Kopenhaga: The Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2014).

### **3.8.2. Analiza wyników badań behawioralnych**

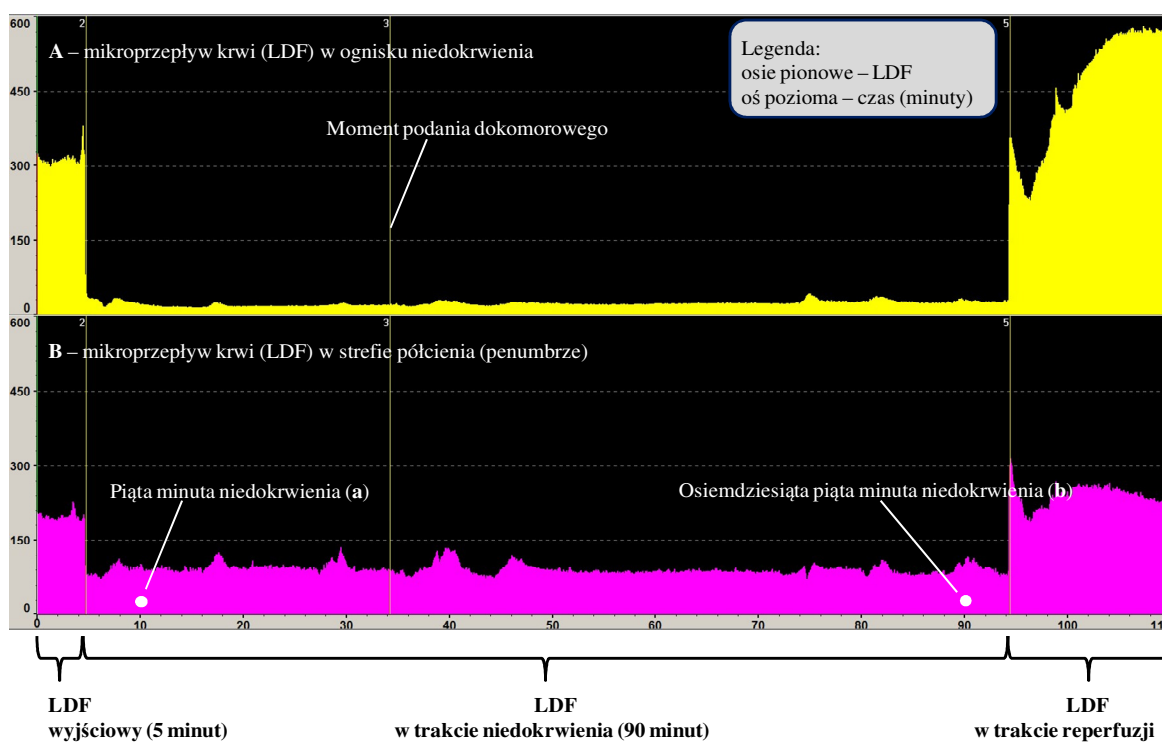
Nagrania z testu CatWalk 7.1. były wstępnie analizowane z użyciem programu dołączonego przez producenta (Noldus), natomiast nagrania z testu otwartego pola wstępnie analizowano w programie EthoVision XT 10. Wszystkie parametry otrzymane z obu testów zostały wstępnie wyrażone jako wartości średnie z wykonania przed MCAOR i 72 godziny po rozpoczęciu reperfuzji, a następnie jako średnie zmiany procentowe ( $\Delta\%$ ), wyrażające procentową różnicę pomiędzy wykonaniem testu przed MCAOR i 72 godziny po rozpoczęciu reperfuzji, według wzoru:  $\Delta\% = [(\text{wynik przed MCAOR} - \text{wynik 72 godziny po MCAOR}) / \text{wynik przed MCAOR}] * 100\%$ .

Dane z testu CatWalk były analizowane statystycznie pod względem zmian wewnątrzgrupowych – analiza różnicy między stanem przed udarem i 72 godziny po rozpoczęciu reperfuzji (test t-Studenta dla pomiarów powtarzanych, dla każdego parametru oddzielnie) oraz pod względem różnic międzygrupowych (porównanie średnich zmian procentowych), które były analizowane przy pomocy jednoczynnikowej ANOVA i testu porównań wielokrotnych LSD Fisher'a. Dane z testu otwartego pola także porównywano wewnątrzgrupowo (test t-Studenta dla pomiarów powtarzanych), porównania międzygrupowe wykonano jednoczynnikową ANOVA.

### **3.8.3. Analiza wyników oceny zaburzeń regulacji mikrokrążenia krwi i stopnia rekrutacji krążenia obocznego do strefy półcienia w czasie niedokrwienia**

W doświadczeniach, które miały na celu zbadanie reaktywności naczyń mikrokrążenia kory mózgowej na hiperkapnię i zablokowanie syntazy NO, analizę zmian parametrów gazometrycznych i ciśnienia tętniczego krwi wykonano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), z testem porównań wielokrotnych LSD Fisher'a. Analizę

charakterystyki hemodynamicznej obszarów ogniska niedokrwienia i strefy półcienia, czyli zmian przepływów LDF w tych regionach przeprowadzono testem t-Studenta dla jednej zmiennej względem stałej 0% zmiany (ang. *One sample t-test*), porównanie zmian przepływu pomiędzy tymi obszarami wykonano testem t-Studenta dla pomiarów zależnych (porównanie pomiędzy regionem ogniska i penumbry w grupie), natomiast analizę międzygrupową w ramach danego obszaru przeprowadzono jednoczynnikową ANOVA i testem porównań wielokrotnych LSD Fisher'a. Analizę stopnia rekrutacji krążenia obocznego do strefy penumbry przeprowadzono w oparciu o wyliczenie zmiany procentowej ( $\Delta\%$ ): 85 minuta niedokrwienia vs 5 minuta niedokrwienia w grupie kontrolnej i w grupie z NPY(13-36) podanym w trakcie niedokrwienia (Rycina 11 B). Istotność tej zmiany przepływu oceniano testem t-Studenta dla jednej zmiennej względem stałej 0% zmiany.



**Rycina 11.** Przykładowe zapisy LDF w korze mózgowej w trakcie niedokrwienia i reperfuzji mózgu w ognisku niedokrwienia (**panel A**) i w strefie półcienia (**panel B**). W strefie półcienia oceniana była zmiana mikroprzepływu krwi w 85 minucie niedokrwienia vs 5 minuta niedokrwienia, mająca na celu oszacowanie ewentualnego wzrostu przepływu po podaniu NPY(13-36), który odzwierciedlałby rekrutację krążenia obocznego. Zmianę mikroprzepływu określano jako zmianę procentową według wzoru:  $\Delta\% = [(przeptyw\ w\ punkcie\ b - przeptyw\ w\ punkcie\ a) / przeptyw\ w\ punkcie\ a] * 100\%$ .

### 3.8.4. Analiza wyników oceny gęstości i szczelności naczyń mikrokrążenia

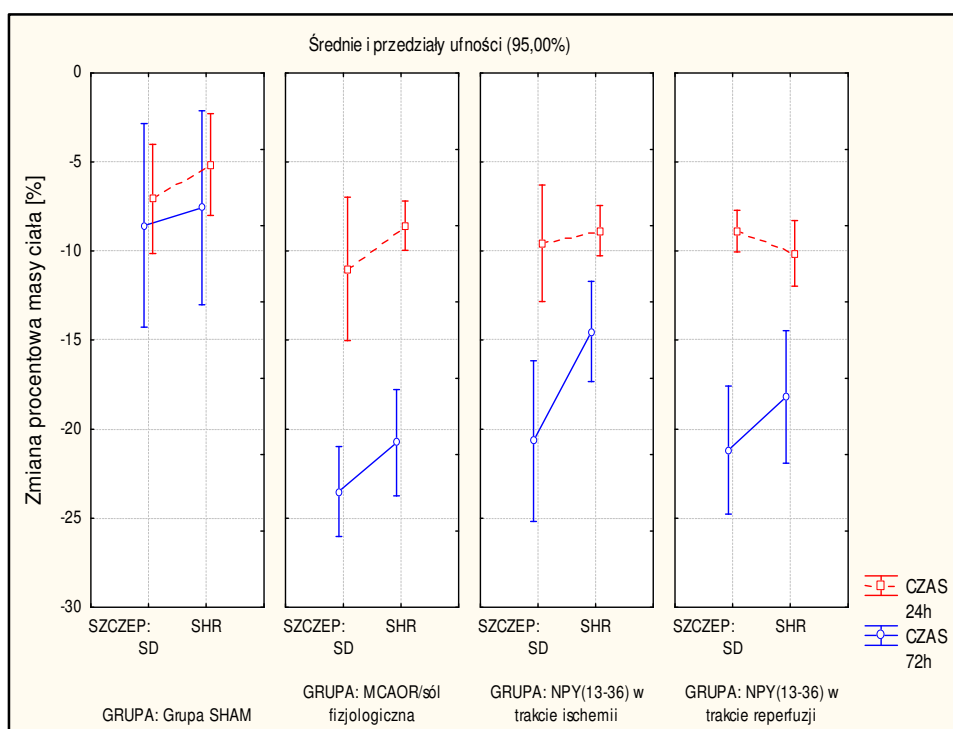
Dane uzyskane z kwantyfikacji gęstości i stopnia przeciekania mikronaczyń kory mózgowej analizowano jednoczynnikową ANOVA i testem porównań wielokrotnych LSD Fisher'a oraz testem t-Studenta dla pomiarów niezależnych.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Analiza zmian masy ciała szczurów w kolejnych dobach po reperfuzji mózgu

Na Rycinie 12 przedstawiono zmiany procentowe masy ciała zwierząt 24 i 72 godziny po faktycznym lub pozorowanym niedokrwieniu i reperfuzji mózgu u szczurów szczepów SD i SHR (dla zachowania czytelności nie zaznaczono istotności statystycznej). Test t-Studenta dla zmiennych zależnych wykazał, że 24 godziny po reperfuzji nastąpił statystycznie istotny ( $p < 0,01$ ) i porównywalny spadek masy ciała szczurów w każdej z badanych grup szczurów SD i SHR. Był to spadek wynoszący od 8 do 13% masy sprzed niedokrwienia lub niedokrwienia pozorowanego SHAM. W kolejnych dobach masa ciała szczurów SHAM SD i SHAM SHR nie ulegała zmianie, natomiast w pozostałych grupach obniżyła się istotnie statystycznie ( $p < 0,05 - 0,001$ ) od 15 do 23% masy sprzed niedokrwienia, jak wykazały pomiary przeprowadzone 72 godziny po reperfuzji.

Trzyczynnikowa ANOVA (szczep\*grupa\*czas) wykazała istotny wpływ czynników takich jak szczep ( $p < 0,01$ ), grupa ( $p < 0,001$ ) oraz czas podania NPY(13-36) ( $p < 0,001$ ) na wielkość zmiany masy ciała. Test *post hoc* LSD Fisher'a wykazał, że masa ciała szczurów SD i SHR w grupie kontrolnej (MCAOR/sól fizjologiczna) 72 godziny po reperfuzji mózgu była istotnie mniejsza ( $p < 0,001$ ) niż masa szczurów SD i SHR 72 godziny po niedokrwieniu pozorowanym. Podanie NPY(13-36) nie miało wpływu na masę zwierząt w żadnej z grup (SD vs SHR; 24 godziny vs 72 godziny po reperfuzji lub niedokrwieniu pozorowanym).



**Rycina 12.** Zmiany masy ciała szczurów szczepów SD i SHR w czasie 24 godzin i 72 godzin po reperfuzji lub procedurze SHAM. Dane przedstawiono jako średnie zmiany procentowe masy (vs masa w dniu procedury) wraz z 95% przedziałami ufności. Dokładny opis znajduje się w tekście.

## **4.2. Charakterystyka hemodynamiczna ogniska niedokrwienia i strefy półcienia w czasie niedokrwienia i reperfuzji u szczurów szczepu SD i SHR, wpływ NPY(13-36)**

Do analizy danych mikroprzepływu krwi w korze mózgowej w grupach kontrolnych (MCAOR z podaniem soli fizjologicznej i.c.v.) pulowano dane uzyskane z badań szczurów, którym podawano sól fizjologiczną 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji. W ten sposób utworzono grupy kontrolne dla szczepów SD oraz SHR.

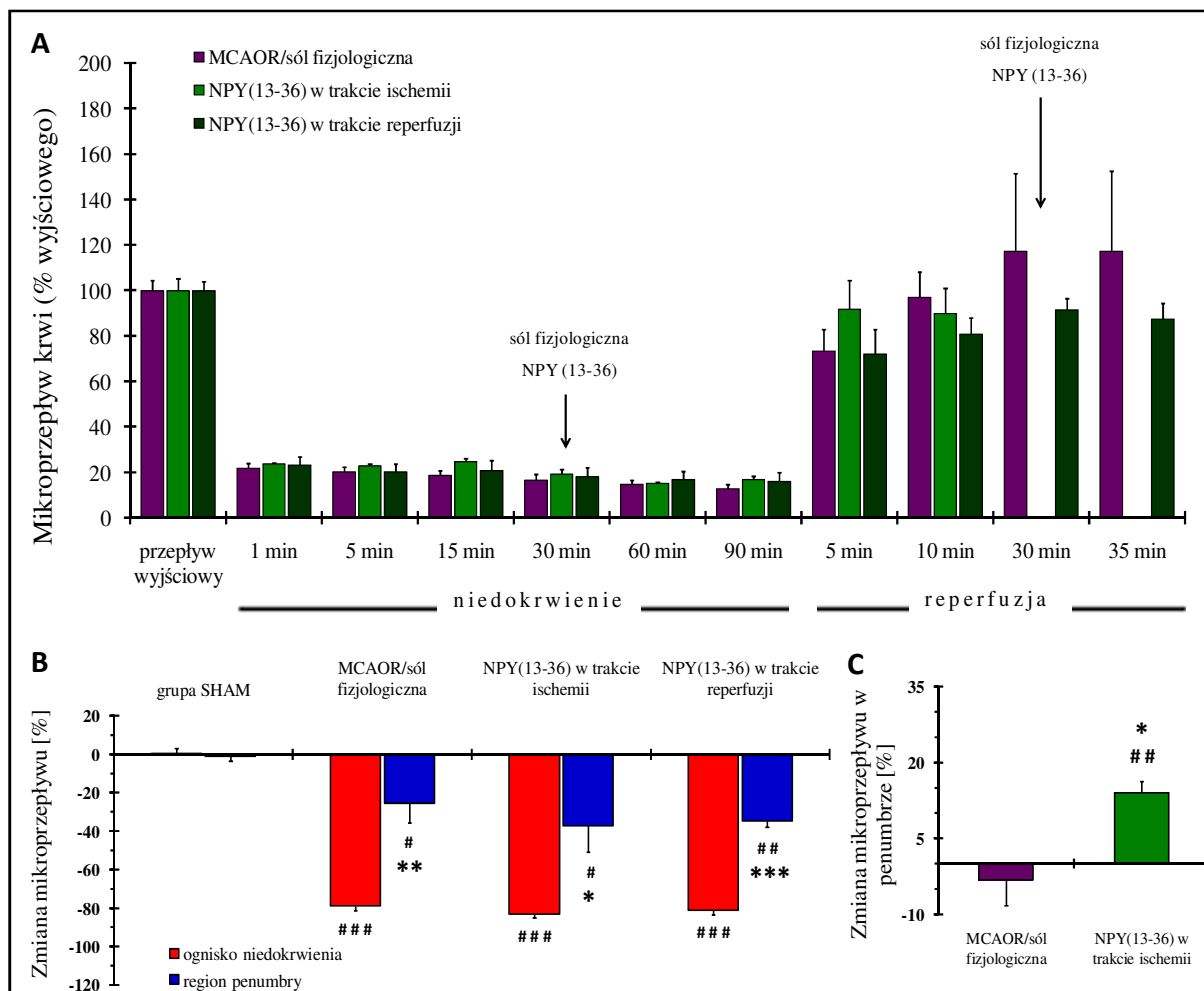
### **4.2.1. Zmiany LDF podczas ogniskowego niedokrwienia i reperfuzji mózgu u szczurów szczepu SD**

U szczurów SD obniżenie sygnału LDF w regionie ogniska niedokrwienia podczas 90 minut niedokrwienia i jego powrót w czasie reperfuzji były porównywalne w grupie kontrolnej i u szczurów traktowanych agonistą receptorów Y2 – NPY(13-36), Rycina 13 A. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami. Podczas 90 minut niedokrwienia sygnał LDF w tym obszarze kory mózgowej utrzymywał się na poziomie od 20% do 10% wartości sprzed niedokrwienia, w każdej z grup.

Analiza wyników pomiarów LDF w korze mózgowej w ognisku i obszarze półcienia ischemicznego w 5 minucie po wywołaniu niedokrwienia mózgu (test t-Studenta dla jednej zmiennej), wykazała istotny ( $p < 0,001$ ), około 80% spadek LDF w obszarze ogniska niedokrwienia oraz około 25% spadek w penumbrze w każdej z grup szczurów ( $p < 0,05 - 0,01$ ), jak przedstawiono na Rycinie 13 B. U szczurów z niedokrwieniem pozorowanym SHAM nie odnotowano zmiany sygnału LDF w obu badanych obszarach kory mózgowej. Nie odnotowano różnic międzygrupowych (grupy z niedokrwieniem/reperfuzją mózgu) w wielkości zmian sygnału LDF podczas pomiarów w regionach ogniska i penumbry, w trakcie niedokrwienia (jednoczynnikowa MANOVA, Lambda Wilks'a:  $\Lambda = 0,88$ ;  $F(4, 30) = 0,49$ ;  $p = 0,75$ ).

Na Rycinie 13 C przedstawiono wyniki analizy poziomu LDF w 85 minucie niedokrwienia w stosunku do LDF w 5 minucie niedokrwienia w strefie penumbry, w grupie kontrolnej (szczury, którym podano dokomorowo sól fizjologiczną w trakcie niedokrwienia) oraz w grupie szczurów, którym podano NPY(13-36) w trakcie niedokrwienia. Celem tych obliczeń było sprawdzenie czy mikroprzepływ krwi w korze mózgowej utrzymywał się na podobnym poziomie przez cały czas trwania niedokrwienia w obu badanych grupach zwierząt, co w założeniu badania miało oszacować stopień rekrutacji krążenia obocznego. W grupie kontrolnej poziom LDF w 85 minucie niedokrwienia nie różnił się istotnie

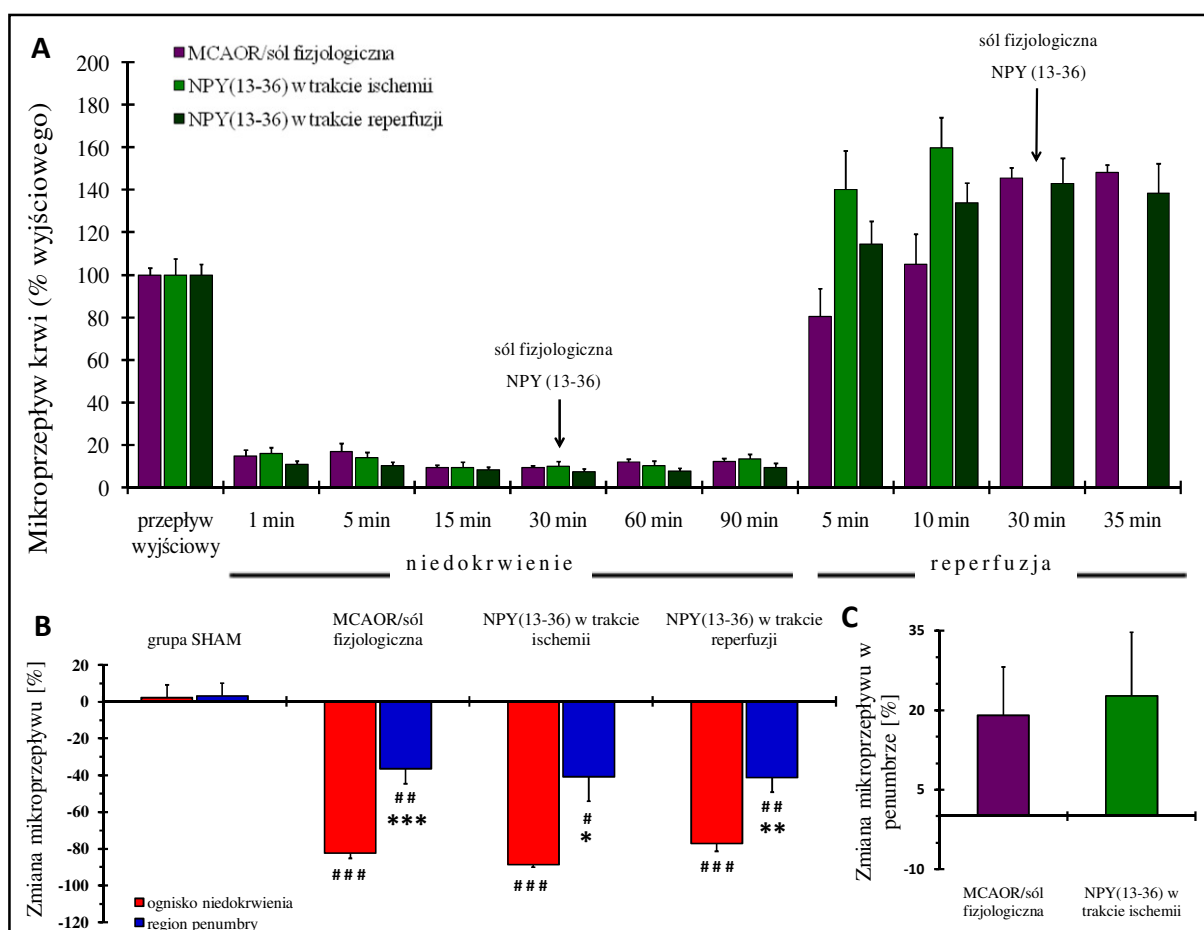
statystycznie (test t-Studenta dla jednej zmiennej;  $t(6) = 0,65$ ;  $p = 0,54$ ) od poziomu w 5 minucie niedokrwienia, natomiast w grupie traktowanej NPY(13-36) 30 minut po wywołaniu niedokrwienia LDF wzrósł o ~14% ( $t(5) = 5,52$ ;  $p < 0,01$ ). Test t-Studenta dla pomiarów niezależnych wykazał istotną różnicę międzygrupową ( $t(11) = 2,97$ ;  $p < 0,05$ ).



**Rycina 13.** Zmiany hemodynamiczne w obszarach ogniska niedokrwienia i penumbry w czasie 90-minutowego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczurów SD. Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM. **Panel A** – zapis LDF w ciągu 90 minut niedokrwienia i 15-35 minut reperfuzji w grupie kontrolnej oraz w grupach traktowanych NPY(13-36) (grupa kontrolna –  $n = 10$ , grupa NPY(13-36) podany podczas MCAO –  $n = 8$ , grupa NPY(13-36) podany w czasie reperfuzji –  $n = 6$ ). Strzałki oznaczają moment dokomorowego podania NPY(13-36) lub soli fizjologicznej. **Panel B** – porównanie procentowego spadku LDF w korze mózgowej w stosunku do wartości wyjściowej pomiędzy obszarem ogniska niedokrwienia i penumbry 5 minut po zamknięciu MCA lub po wywołaniu niedokrwienia pozorowanego (SHAM). #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  (test t-Studenta dla jednej zmiennej). U szczurów z niedokrwieniem spadek w obszarze półcienia był znacznie mniejszy niż w obszarze ogniska niedokrwienia, wykazując różne obszary hemodynamiczne. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs obszar ogniska (test t-Studenta dla pomiarów zależnych), brak różnic międzygrupowych w ramach obu obszarów (MANOVA). **Panel C** – porównanie międzygrupowe procentowej zmiany wielkości przepływu w obszarze penumbry w 85 minucie względem 5 minuty od rozpoczęcia niedokrwienia. ##  $p < 0,01$  (vs 5 minuta, test t-Studenta dla jednej zmiennej); \*  $p < 0,05$  (vs grupa kontrolna, test t-Studenta dla pomiarów niezależnych).

#### 4.2.2. Zmiany LDF podczas ogniskowego niedokrwienia i reperfuzji mózgu u szczurów szczepu SHR

U szczurów SHR obniżenie LDF podczas niedokrwienia i jego powrót w czasie reperfuzji (Rycina 14 A) były porównywalne w grupie kontrolnej i u szczurów, którym podano agonistę receptorów Y2 – NPY(13-36), podobnie jak u szczurów SD.



**Rycina 14.** Zmiany hemodynamiczne w obszarach ogniska niedokrwionego i penumbry w czasie 90-minutowego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczurów SHR. Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM. **Panel A** – zapis LDF w ciągu 90 minut niedokrwienia i 15-35 minut reperfuzji w grupie kontrolnej oraz w grupach traktowanych NPY(13-36) (grupa kontrolna –  $n = 9$ , grupa NPY(13-36) podany podczas MCAO –  $n = 6$ , grupa NPY(13-36) podany w czasie reperfuzji –  $n = 5$ ). Strzałki oznaczają moment dokomorowego podania NPY(13-36) lub soli fizjologicznej. **Panel B** – porównanie procentowego spadku LDF w korze mózgowej w stosunku do wartości wyjściowej pomiędzy obszarem ogniska niedokrwienia i strefą półcienia (penumbry) podczas początkowych 5 minut niedokrwienia/SHAM; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  (test t-Studenta dla jednej zmiennej), brak różnic międzygrupowych w ramach obu obszarów (MANOVA). U szczurów z niedokrwieniem spadek w obszarze półcienia był znacznie mniejszy niż w obszarze ogniska niedokrwienia, wykazując różne obszary hemodynamiczne; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs obszar ogniska (test t-Studenta dla pomiarów zależnych). **Panel C** – porównanie międzygrupowe procentowej zmiany wielkości przepływu w obszarze penumbry w 85 minucie względem 5 minuty od rozpoczęcia niedokrwienia. Brak różnic wewnątrzgrupowych (test t-Studenta dla jednej zmiennej).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami. Podczas 90 minut niedokrwienia sygnał LDF w obszarze mózgu zaopatrywanym w krew przez tętnicę MCA (region ogniska niedokrwienia) utrzymywał się na poziomie od 20% do 10% wartości sprzed niedokrwienia, w każdej z grup. Poziom redukcji przepływu krwi był stabilny i nie było istotnych różnic międzygrupowych w żadnym punkcie czasowym niedokrwienia. Powrót sygnału LDF podczas wczesnej reperfuzji był również porównywalny we wszystkich grupach szczurów SHR.

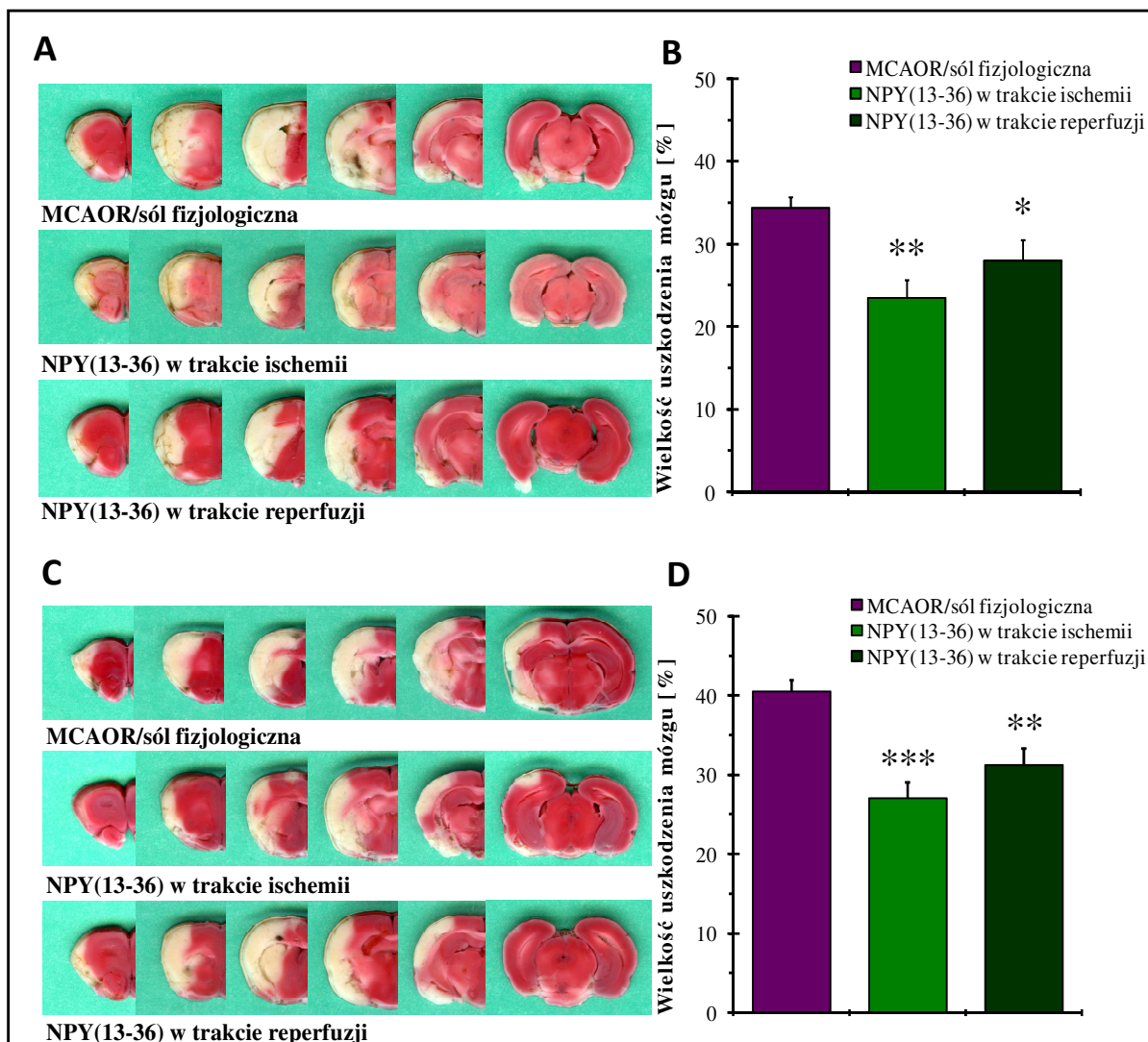
Analiza (testem t-Studenta dla jednej zmiennej) wyników pomiarów LDF w korze mózgowej podczas 5 minuty ogniskowego niedokrwienia mózgu, wykazała istotny, około 80% spadek w regionie ogniska niedokrwienia ( $p < 0,001$ ) oraz około 20% spadek w regionie penumbry ( $p < 0,05 - 0,001$ ), w każdej z grup szczurów, którym wywoływano przejściowe niedokrwienie mózgu, jak przedstawiono na Rycinie 14 B. Nie odnotowano różnic międzygrupowych ani w regionie ogniska, ani penumbry (jednoczynnikowa MANOVA, Lambda Wilks'a:  $\Lambda = 0,73$ ;  $F(4, 30) = 1,31$ ;  $p = 0,29$ ). U szczurów z niedokrwieniem pozorowanym (SHAM) nie odnotowano istotnego spadku sygnału LDF w żadnym z badanych regionów kory mózgowej.

Na Rycinie 14 C przedstawiono wyniki analizy poziomu LDF w 85 minucie niedokrwienia w stosunku do poziomu LDF w 5 minucie niedokrwienia w strefie penumbry, w grupie kontrolnej (podanie dokomorowe soli fizjologicznej w trakcie niedokrwienia) oraz w grupie szczurów, którym podano NPY(13-36) w trakcie niedokrwienia. Poziom LDF w 85 minucie niedokrwienia w grupie kontrolnej nie różnił się statystycznie istotnie od poziomu w 5 minucie niedokrwienia, chociaż widać było wyraźną tendencję wzrostową z dużym rozrzutem wartości. Podobna sytuacja była w grupie szczurów SHR, które otrzymały NPY(13-36) w czasie niedokrwienia. Nie stwierdzono istotnych różnic wewnątrzgrupowych (t.j. między 5 i 85 minutą niedokrwienia w grupie kontrolnej i grupie, której podano NPY(13-36)), ( $t(7) = 2,09$ ;  $p = 0,07$ ;  $t(4) = 1,88$ ;  $p = 0,13$ ; test t-Studenta dla jednej zmiennej).

#### ***4.3. Wpływ NPY(13-36) na wielkość obszaru mózgu uszkodzonego niedokrwieniem u szczurów szczepu SD i SHR***

Wielkość obszaru uszkodzenia mózgu, była znacząco mniejsza w grupie szczurów SD traktowanych NPY(13-36) podczas niedokrwienia i w czasie reperfuzji, w porównaniu z kontrolnymi szczurami SD, którym podawano dokomorowo tylko sól fizjologiczną

(jednoczynnikowa ANOVA,  $F(3, 25) = 7,87$ ) (Rycina 15 A i B). W grupie kontrolnej,  $34,4 \pm 1,4\%$  ipsilateralnej półkuli mózgu uległo uszkodzeniu 72 godziny po reperfuzji (Rycina 15 B). U szczurów, którym podano NPY(13-36) 30 minut po rozpoczęciu okluzji tętnicy MCA, wielkość uszkodzenia mózgu wynosiła  $23,6 \pm 2,2\%$  ( $p < 0,005$  vs grupa kontrolna), podczas gdy u szczurów, którym podawano ten peptyd 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji wyniosła  $28,0 \pm 2,5\%$ , co również różniło się istotnie statystycznie od wielkości zawału w grupie kontrolnej ( $p < 0,05$ ).



**Rycina 15.** Wpływ NPY(13-36) na wielkość uszkodzenia mózgu po 90-minutowym niedokrwieniu i reperfuzji (mierzone 72 godziny po reperfuzji). **A i C** – reprezentatywne skrawki mózgow (przekroje czołowe) wybarwione TTC (**panel A** – szczury SD; **panel C** – szczury SHR), **B i D** – morfometryczna analiza obszaru uszkodzenia mózgu szczurów SD (**panel B**; grupa kontrolna –  $n = 10$ , grupa z NPY(13-36) podanym podczas MCAO –  $n = 8$ , grupa z NPY(13-36) podanym po reperfuzji –  $n = 6$ ) i SHR (**panel D**; grupa kontrolna –  $n = 10$ , grupa z NPY(13-36) podanym podczas MCAO –  $n = 7$ , grupa z NPY(13-36) podanym po rozpoczęciu reperfuzji –  $n = 6$ ). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie  $\pm$  SEM, jednoczynnikowa ANOVA i test Dunnett'a (różnica pomiędzy grupą badaną vs grupa kontrolna: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



U szczurów SHR, jak pokazano na Rycinie 15 C i D, 72 godziny po reperfuzji w grupie kontrolnej uszkodzenie obejmowało  $40,48 \pm 1,41\%$  ipsilateralnej półkuli mózgu. Wielkość uszkodzenia była istotnie mniejsza w obu grupach, którym podano NPY(13-36) w porównaniu z grupą kontrolną (jednoczynnikowa ANOVA,  $F(2, 20) = 17,01$ ;  $p < 0,001$ ).

U szczurów traktowanych NPY(13-36) 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia, wielkość uszkodzenia wynosiła  $27,03 \pm 2,0\%$  i była mniejsza o 33,25% w porównaniu z uszkodzeniem w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ). U szczurów traktowanych NPY(13-36) minut po rozpoczęciu reperfuzji uzyskano podobne wyniki. Wielkość zawału wynosiła  $31,23 \pm 2,1\%$  półkuli ipsilateralnej, co oznaczało zmniejszenie wielkości uszkodzenia o 22,85% w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,01$ ).

#### **4.3.1. Analiza porównawcza wpływu NPY(13-36) na poniedokrwienne uszkodzenie mózgu u szczurów szczepu SD i szczurów szczepu SHR**

W Tabeli 4 przedstawiono wyniki porównania wielkości uszkodzeń mózgu u szczurów kontrolnych SD oraz SHR, zmierzonych 72 godziny po reperfuzji. Analiza porównawcza wykazała, że szczury SHR miały istotnie większe uszkodzenie mózgu ( $p = 0,006$ ) niż szczury SD.

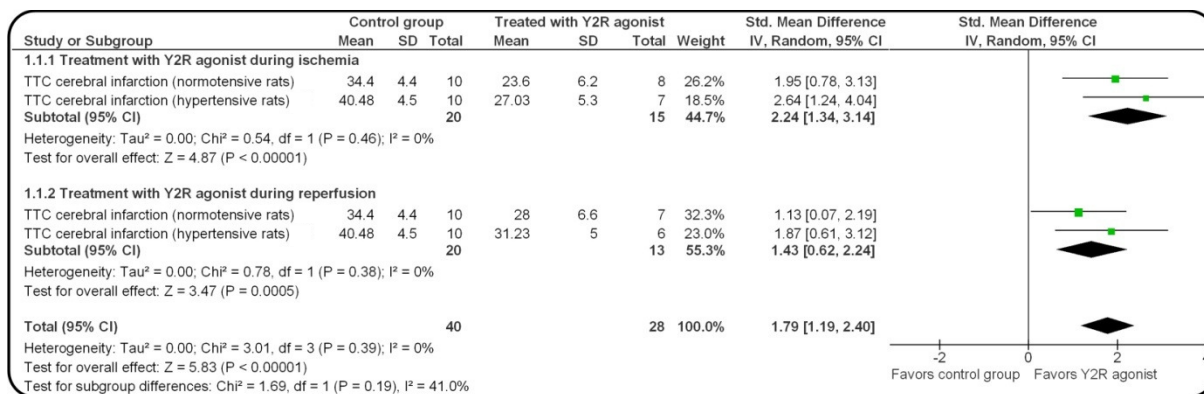
**Tabela 4.** Porównanie wielkości uszkodzenia mózgu w grupach kontrolnych u szczurów SD i SHR, test t-Studenta dla pomiarów niezależnych.

Szczep szczurów	Średnia $\pm$ SEM [%]	t (test t-Studenta)	p	d Cohen'a
SD (n= 10)	$34,40 \pm 1,36$	3,11	0,006	1,39
SHR (n = 10)	$40,48 \pm 1,41$			

Rycina 16 przedstawia wyniki metaanalizy wykonanej w celu porównania wpływu NPY(13-36) na uszkodzenie ischemiczne u szczurów SD (z prawidłowym ciśnieniem tętniczym) i u szczurów SHR (szczury z nadciśnieniem). Analiza wykazała istotnie duże rozmiary efektu, wyrażone jako SMD (ang. *Standardized mean difference*), całkowita wielkość efektu:  $SMD = 1,79$ ;  $Z = 5,83$ ;  $P < 0,00001$  oraz podobieństwo skuteczności działania NPY(13-36) u obu szczepów szczurów (heterogeniczność w podgrupie z NPY(13-36) podanym czasie niedokrwienia:  $I^2 = 0\%$ ;  $P = 0,46$ ; heterogeniczność w podgrupie z NPY(13-36) podanym w czasie reperfuzji:  $I^2 = 0\%$ ;  $P = 0,38$ ). Podobnie, nie było istotnej różnicy w skuteczności NPY(13-36) zależnej od momentu podania (różnica

między podgrupami nie była istotna statystycznie:  $I^2 = 41\%$ ;  $P = 0,19$ ).

Podsumowując, wyniki tej metaanalizy uprawniają do stwierdzenia, że NPY(13-36) zadziałał z jednakową skutecznością zarówno u szczurów normotensyjnych jak i szczurów z nadciśnieniem w obu wariantach podania (niedokrwienie lub reperfuzja).



**Rycina 16.** Wykres przedstawiający porównanie wpływu NPY(13-36) na uszkodzenie poniedokrwienne mózgu, mierzone jako objętość uszkodzenia po 72 godzinach od reperfuzji mózgu u szczurów z prawidłowym ciśnieniem krwi (szczenek SD) i nadciśnieniem tętniczym (szczenek SHR), z wykorzystaniem metody metaanalizy. Oba szczepy szczurów porównano w ramach dwóch podgrup określających podanie NPY(13-36): podczas niedokrwienia i podczas reperfuzji. Nie odnotowano różnicy w skuteczności NPY(13-26) pomiędzy podgrupami oraz w ich obrębie. Na wykresie kwadraty i linie poziome reprezentują SMD (standaryzowana różnica średnich) indywidualnego badania oraz 95% przedziały ufności (CI), a romby reprezentują średnią ważoną SMD i 95% CI, SD – odchylenie standardowe średniej,  $I^2$  – wskaźnik heterogeniczności.

#### 4.4. Analiza sprawności chodu i sponatnicznej aktywności ruchowej 72 godziny po reperfuzji mózgu, wpływ NPY(13-36)

Podobnie jak w poprzednich analizach, grupę kontrolną (MCAOR z podaniem soli fizjologicznej) dla każdego ze szczepów (SD, SHR) utworzono ze szczurów, którym podawano sól fizjologiczną 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji.

##### 4.4.1. Zmiany parametrów chodu u szczurów szczepu SD w teście CatWalk

Niedokrwienie/reperfuzja mózgu miało największy wpływ na parametry czasowe chodu szczurów SD (Tabela 5).

Tabela 5. Wpływ MCAOR na parametry chodu u szczurów SD (grupa kontrolna, n = 9).

Parametr chodu	Łapa	Przed MCAOR Średnia ± SEM	72 h po MCAOR Średnia ± SEM	t (t-test)	p	Wielkość efektu d Cohen'a
<b>Parametry czasowe</b>						
Średni czas przebiegu [s]		1,544 ± 0,101	3,165 ± 0,444 <sup>##</sup>	-3,81	0,0051	1,68
Średnia prędkość przebiegu [cm/s]		75,391 ± 4,932	41,099 ± 5,359 <sup>###</sup>	7,40	0,0001	2,22
Czas cyklu kroku [s]	PP	0,204 ± 0,007	0,311 ± 0,024 <sup>###</sup>	-5,53	0,0006	2,02
	LP	0,202 ± 0,006	0,310 ± 0,024 <sup>###</sup>	-5,28	0,0007	2,01
	PT	0,201 ± 0,007	0,305 ± 0,023 <sup>###</sup>	-5,44	0,0006	2,01
	LT	0,205 ± 0,007	0,310 ± 0,024 <sup>###</sup>	-5,23	0,0008	1,99
Czas podparcia łapą [s]	PP	0,121 ± 0,004	0,188 ± 0,014 <sup>###</sup>	-5,29	0,0007	2,07
	LP	0,123 ± 0,004	0,187 ± 0,014 <sup>##</sup>	-4,74	0,0014	1,96
	PT	0,125 ± 0,005	0,193 ± 0,017 <sup>##</sup>	-4,70	0,0015	1,75
	LT	0,125 ± 0,005	0,202 ± 0,019 <sup>##</sup>	-4,83	0,0013	1,81
Czas przeniesienia łapy [s]	PP	0,082 ± 0,003	0,122 ± 0,009 <sup>###</sup>	-5,63	0,0005	1,82
	LP	0,080 ± 0,002	0,122 ± 0,010 <sup>##</sup>	-4,72	0,0015	1,83
	PT	0,076 ± 0,002	0,110 ± 0,006 <sup>###</sup>	-6,14	0,0003	2,26
	LT	0,079 ± 0,003	0,107 ± 0,005 <sup>###</sup>	-6,19	0,0003	2,25
Prędkość przeniesienia łapy [pix./s]	PP	1,964 ± 0,114	1,159 ± 0,111 <sup>###</sup>	10,63	0,0000	2,38
	LP	2,078 ± 0,094	1,212 ± 0,118 <sup>###</sup>	9,18	0,0000	2,70
	PT	2,134 ± 0,098	1,261 ± 0,093 <sup>###</sup>	10,20	0,0000	3,04
	LT	2,001 ± 0,103	1,239 ± 0,075 <sup>###</sup>	8,13	0,0000	2,80
Współczynnik podparcia [%]	PP	60,04 ± 0,827	60,89 ± 0,764	-1,11	0,2990	0,36
	LP	60,84 ± 0,923	61,02 ± 0,988	-0,11	0,9116	0,06
	PT	61,92 ± 1,112	63,46 ± 0,936	-1,42	0,1922	0,50
	LT	61,42 ± 0,942	64,55 ± 1,213 <sup>#</sup>	-3,31	0,0107	0,96
<b>Parametry przestrzenne</b>						
Długość kroku [pix.]	PP	155,05 ± 3,51	129,75 ± 3,16 <sup>###</sup>	7,03	0,0001	2,52
	LP	160,67 ± 3,81	134,37 ± 3,44 <sup>###</sup>	6,51	0,0002	2,41
	PT	158,75 ± 3,76	133,00 ± 3,35 <sup>###</sup>	7,36	0,0001	2,41
	LT	154,71 ± 3,65	129,36 ± 3,31 <sup>###</sup>	8,13	0,0000	2,42
Powierzchnia śladu [pix. <sup>2</sup> ]	PP	167,86 ± 5,94	149,63 ± 4,70 <sup>#</sup>	2,97	0,0176	1,13
	LP	171,15 ± 4,88	138,43 ± 6,61 <sup>##</sup>	4,81	0,0013	1,88
	PT	145,91 ± 8,04	139,39 ± 3,24	0,83	0,4256	0,35
	LT	138,97 ± 5,26	143,46 ± 5,37	-0,79	0,4510	0,28
Rozstaw kończyn [pix.]	PŁ	23,203 ± 0,880	19,154 ± 0,484 <sup>##</sup>	4,44	0,0022	1,90
	TŁ	33,572 ± 0,850	25,967 ± 1,616 <sup>###</sup>	6,35	0,0002	1,96

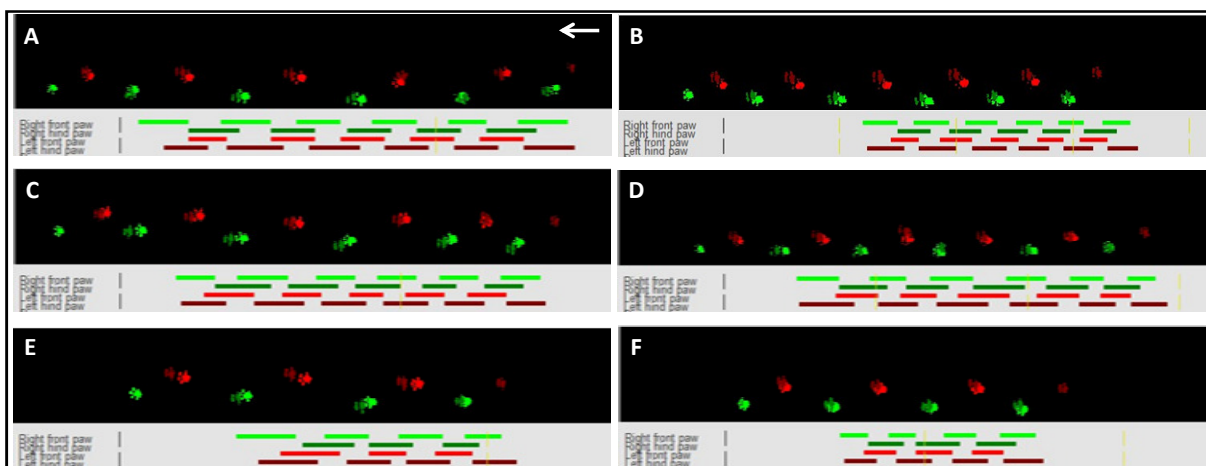
PP – prawa przednia łapa, LP – lewa przednia łapa, PT – prawa tylna łapa, LT – lewa tylna łapa, PŁ – przednie łapy, TŁ – tylne łapy; pix. – piksele. Dane przedstawione są w postaci: średnie ± błąd standardowy średniej (SEM). <sup>#</sup> p < 0,05; <sup>##</sup> p < 0,01; <sup>###</sup> p < 0,001 (test t-Studenta dla pomiarów powtarzanych)

Siedemdziesiąt dwie godziny po reperfuzji w grupie kontrolnej wydłużyły się zarówno czas fazy podporu każdą kończyną, jak i czas przeniesienia każdej z kończyn, a prędkość przeniesienia zmniejszyła się dla wszystkich kończyn, w porównaniu z ich wartościami

kontrolnymi przed niedokrwieniem u każdego szczura. Czas fazy podporu lewą przednią łapą (LP) wzrósł o 52,0% (z  $0,123 \pm 0,005$  s przed niedokrwieniem do  $0,187 \pm 0,014$  s,  $t(8) = -4,74$ ;  $p < 0,005$ ) 72 godziny po reperfuzji.

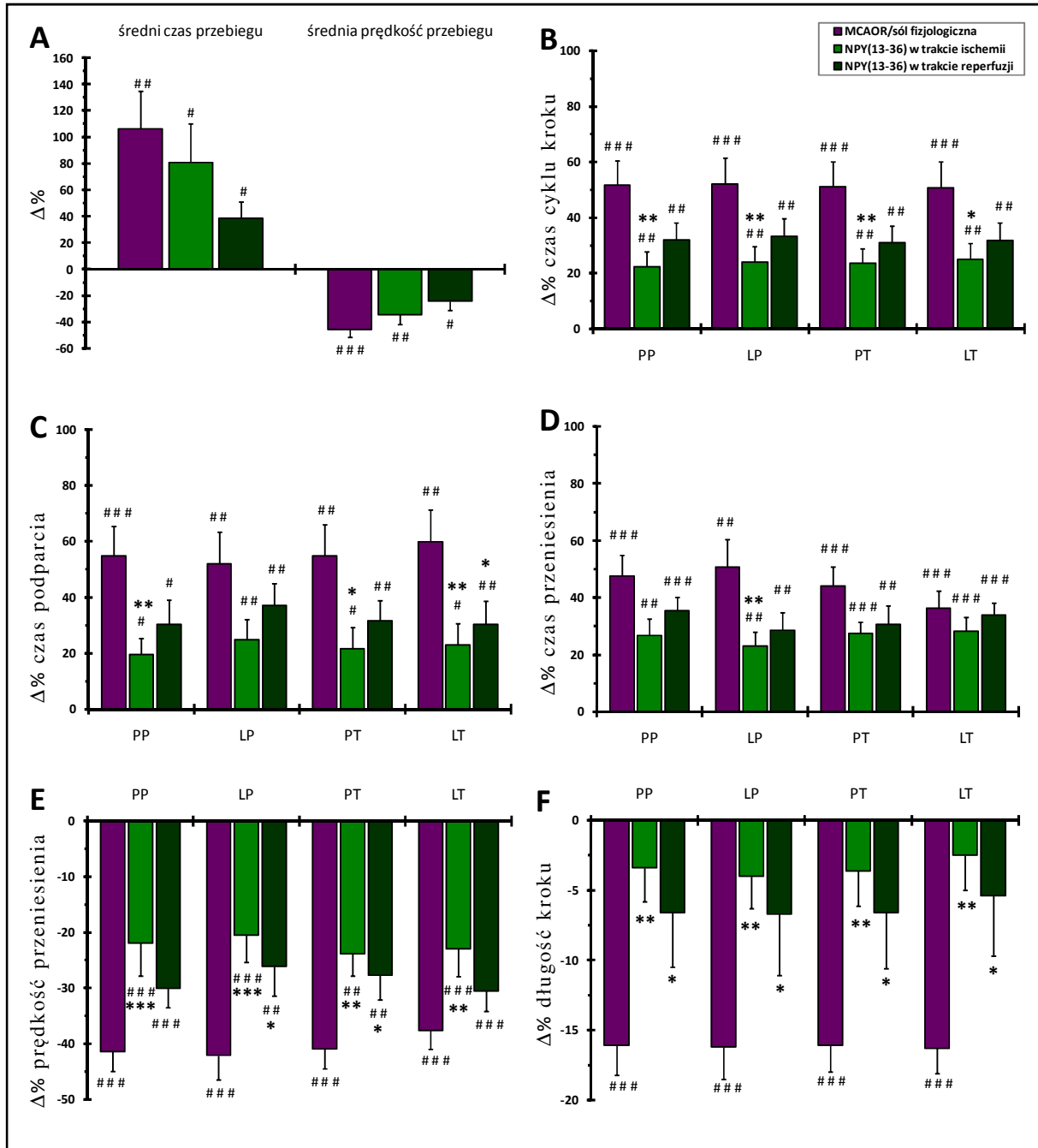
Czas fazy przeniesienia łapy LP wzrósł o 50,6% (z  $0,081 \pm 0,002$  s do  $0,122 \pm 0,010$  s,  $t(8) = -4,73$ ;  $p < 0,005$ ), natomiast prędkość przeniesienia tej łapy spadła o 42,1% (z  $2,078 \pm 0,094$  pikseli/s do  $1,212 \pm 0,118$  pikseli/s,  $t(8) = 9,18$ ;  $p < 0,001$ ). Zmiany parametrów czasowych pozostałych trzech kończyn były statystycznie istotne i podobne do opisanych dla łapy LP, za wyjątkiem współczynnika podparcia, który zmalał jedynie dla tylnej, lewej łapy, w stosunkowo małym stopniu ( $d$  Cohen'a = 0,96). Spadek prędkości przeniesienia łapy oraz wydłużenie faz podporowej i przenoszenia kończyny przełożyły się na istotny wzrost całego cyklu kroku dla każdej kończyny ( $p < 0,001$ , Tabela 5).

Wśród analizowanych parametrów przestrzennych chodu, jedynie długość kroku uległa zmniejszeniu – średnio o 16% ( $p < 0,005$ ) dla każdej łapy 72 godziny po przywróceniu drożności tętnicy MCA. Kolejny analizowany parametr przestrzenny – powierzchnia śladu zmienił się tylko dla obu przednich łap, dla łapy LP zmniejszył się z  $171,15 \pm 4,88$  do  $138,43 \pm 6,61$  pikseli<sup>2</sup> ( $t(8) = 4,82$ ;  $p < 0,005$ ), a łapy PP z  $167,86 \pm 5,94$  do  $149,64 \pm 4,70$  pikseli<sup>2</sup> ( $t(8) = 2,98$ ;  $p < 0,05$ ), jak pokazano w Tabeli 5.



**Rycina 17.** Wyniki testu CatWalk, przykładowe wizualizacje przebiegów szczurów SD z trzech grup; od góry do dołu: grupa kontrolna, grupa z NPY(13-36) podanym w trakcie niedokrwienia mózgu, grupa z NPY(13-36) podanym w trakcie reperfuzji. **Panele A, C, E** – przebiegi przed niedokrwieniem; **panele B, D, F** – przebiegi 72 godziny po reperfuzji. Strzałka oznacza kierunek ruchu, na szarych częściach panelu odległość między pionowymi, przerywanymi liniami oznacza interwał czasowy 1 s. W grupie kontrolnej widoczne dla wszystkich łap silne skrócenie długości kroku oraz spadek liczby kroków stawianych w jednostce czasu. W grupach, którym podawano NPY(13-36) widoczna częściowa normalizacja obu parametrów w stosunku do przebiegu przed niedokrwieniem.

Rozstaw kończyn zmniejszył się z  $23,20 \pm 0,88$  do  $19,15 \pm 0,48$  pikseli ( $t(8) = 4,43$ ;  $p < 0,005$ ) dla przednich łap oraz z  $33,57 \pm 0,85$  do  $25,97 \pm 1,62$  pikseli, ( $t(8) = 6,35$ ;  $p < 0,005$  dla tylnych łap).



**Rycina 18.** Wpływ agonisty receptorów Y2 – NPY(13-36) na parametry chodu w teście CatWalk u szczurów SD 72 godziny po reperfuzji mózgu ( $n = 5 - 9$  szczurów na grupę). Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM zmiany procentowe ( $\Delta\%$ ) między chodem przed niedokrwieniem i po. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  i ###  $p < 0,001$  (różnice wewnątrzgrupowe, test t-Studenta dla pomiarów powtarzanych); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$  vs grupa kontrolna (jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc LSD Fisher'a). PP – prawa przednia łapa, LP – lewa przednia łapa, PT – prawa tylna łapa, LT – lewa tylna łapa.

Analiza chodu testem CatWalk w tej grupie wykazała, że zaburzenia chodu widoczne są również po stronie ciała przeciwległej do półkuli mózgu z uszkodzeniem niedokrwinnym, a wskaźniki wielkości efektu d-Cohena osiągnęły najwyższe wartości w zakresie parametrów czasowych (zakres: 0,06 do 3,04; średnia wartość = 1,84) w porównaniu z parametrami przestrzennymi (zakres: 0,28 do 2,52; średnia wartość = 1,73).

Traktowanie szczurów SD agonistą receptorów Y2 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia mózgu, normalizowało długość kroku dla wszystkich kończyn (Rycina 17 i 18). Dla łapy LP  $t(8) = 1,36$ ; dla łapy PP  $t(8) = 1,16$ ; dla łapy PT  $t(8) = 1,11$ ; dla łapy LT  $t(8) = 0,62$ . Ponadto prędkość przeniesienia łapy wzrosła 72 godziny po reperfuzji dla wszystkich czterech kończyn, w porównaniu z grupą kontrolną, dla łapy LP ( $F(3, 26) = 5,56$ ;  $p < 0,001$ ); dla łapy PP ( $F(3, 26) = 7,87$ ;  $p < 0,001$ ); dla łapy PT ( $F(3, 26) = 4,81$ ;  $p < 0,005$ ); dla łapy LT ( $F(3, 26) = 3,83$ ;  $p < 0,005$ ). Czas przeniesienia uległ skróceniu (poprawie) dla wszystkich łap, jednakże z istotną poprawą tylko dla obu przednich łap, dla łapy LP ( $F(3, 26) = 3,65$ ,  $p < 0,005$ ); dla łapy PP ( $F(3, 26) = 4,23$ ,  $p < 0,005$ ), natomiast czas fazy podparcia uległ istotnemu skróceniu dla wszystkich kończyn, dla łapy LP ( $F(3, 26) = 3,19$ ;  $p < 0,05$ ); dla łapy PP ( $F(3, 26) = 4,85$ ;  $p < 0,005$ ), dla łapy PT ( $F(3, 26) = 4,51$ ;  $p < 0,05$ ); dla łapy LT ( $F(3, 26) = 5,52$ ;  $p < 0,005$ ).

Podanie szczurom NPY(13-36) 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji normalizowało długość kroku, podobnie jak w grupie z NPY(13-36) podanym w trakcie niedokrwienia. Dla łapy LP  $t(6) = 1,60$ ; dla łapy PP  $t(6) = 1,74$ ; dla łapy prawej  $t(6) = 1,74$ ; dla łapy LT  $t(6) = 1,37$  (Rycina 18 D). Był to jedyny parametr, który uległ poprawie w tej grupie dla wszystkich czterech kończyn. Również skrócił się (uległ poprawie) czas fazy podparcia kończyną, dla łap: PP ( $F(3, 26) = 4,85$ ;  $p < 0,05$ ) i LT ( $F(3, 26) = 5,52$ ;  $p < 0,05$ ), czas przeniesienia uległ skróceniu dla LP ( $F(3, 26) = 3,65$ ;  $p < 0,05$ ) oraz wzrosła prędkość przeniesienia dla tej samej łapy ( $F(3, 26) = 5,56$ ;  $p < 0,05$ ), oraz dla łap: PP ( $F(3, 26) = 7,87$ ;  $p < 0,05$ ) i PT ( $F(3, 26) = 4,81$ ;  $p < 0,05$ ).

#### **4.4.2. Zmiany parametrów chodu u szczurów szczepu SHR w teście CatWalk**

Jak pokazano w Tabeli 6, w grupie kontrolnej szczurów szczepu SHR zmiany chodu 72 godziny po reperfuzji mózgu były podobne do tych obserwowanych u szczurów SD. Średni czas przebiegu szczura znamienne ( $p < 0,01$ ) wzrósł o około 70%, a średnia prędkość biegu obniżyła się znamienne ( $p < 0,001$ ) o około 40% w porównaniu z ich wartościami kontrolnymi przed niedokrwieniem/reperfuzją mózgu.

Tabela 6. Wpływ MCAOR na parametry chodu u szczurów SHR (grupa kontrolna, n = 9).

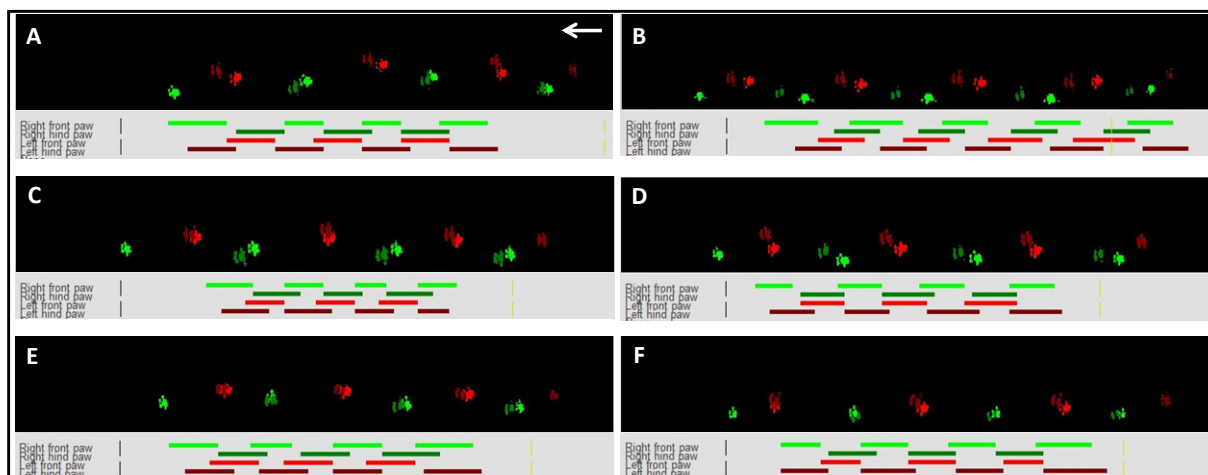
Parametr chodu	Łapa	Przed MCAOR Średnia ± SEM	72 h po MCAOR Średnia ± SEM	t (t-test)	p	Wielkość efektu d Cohen'a
<b>Parametry czasowe</b>						
Średni czas przebiegu [s]		1,244 ± 0,068	2,127 ± 0,215 <sup>##</sup>	-4,66	0,0016	1,84
Średnia prędkość przebiegu [cm/s]		92,259 ± 4,310	57,177 ± 5,519 <sup>###</sup>	7,81	0,0001	2,36
Czas cyklu kroku [s]	PP	0,197 ± 0,007	0,297 ± 0,016 <sup>###</sup>	-7,59	0,0001	2,71
	LP	0,196 ± 0,006	0,293 ± 0,016 <sup>###</sup>	-7,02	0,0001	2,65
	PT	0,193 ± 0,006	0,291 ± 0,017 <sup>###</sup>	-7,16	0,0001	2,61
	LT	0,194 ± 0,007	0,296 ± 0,016 <sup>###</sup>	-7,85	0,0001	2,69
Czas podparcia łapą [s]	PP	0,108 ± 0,004	0,170 ± 0,012 <sup>###</sup>	-6,05	0,0003	2,39
	LP	0,109 ± 0,004	0,170 ± 0,013 <sup>###</sup>	-5,50	0,0006	2,18
	PT	0,122 ± 0,005	0,176 ± 0,012 <sup>###</sup>	-5,80	0,0004	1,95
	LT	0,119 ± 0,006	0,192 ± 0,013 <sup>###</sup>	-6,86	0,0001	2,36
Czas przeniesienia łapy [s]	PP	0,090 ± 0,003	0,126 ± 0,005 <sup>###</sup>	-8,51	0,0000	2,77
	LP	0,087 ± 0,002	0,123 ± 0,006 <sup>###</sup>	-7,10	0,0001	2,84
	PT	0,071 ± 0,002	0,115 ± 0,005 <sup>###</sup>	-8,04	0,0000	3,64
	LT	0,075 ± 0,003	0,104 ± 0,005 <sup>###</sup>	-5,62	0,0005	2,49
Prędkość przeniesienia łapy [pix./s]	PP	2,023 ± 0,077	1,325 ± 0,078 <sup>###</sup>	13,04	0,0000	3,02
	LP	2,168 ± 0,082	1,402 ± 0,093 <sup>###</sup>	9,05	0,0000	2,90
	PT	2,595 ± 0,107	1,461 ± 0,100 <sup>###</sup>	10,31	0,0000	3,65
	LT	2,382 ± 0,118	1,539 ± 0,079 <sup>###</sup>	8,41	0,0000	2,80
Współczynnik podparcia [%]	PP	55,095 ± 0,556	56,933 ± 1,296	-1,26	0,2432	0,61
	LP	55,646 ± 0,568	57,152 ± 1,598	-0,94	0,3725	0,42
	PT	63,163 ± 1,005	59,328 ± 1,099 <sup>#</sup>	2,91	0,0196	1,21
	LT	61,508 ± 1,042	63,694 ± 1,369	-1,41	0,1970	0,60
<b>Parametry przestrzenne</b>						
Długość kroku [pix.]	PP	175,140 ± 3,149	158,477 ± 4,124 <sup>###</sup>	7,88	0,0000	1,51
	LP	183,610 ± 3,574	164,387 ± 4,758 <sup>###</sup>	6,94	0,0001	1,52
	PT	179,351 ± 4,078	160,464 ± 4,745 <sup>###</sup>	5,45	0,0006	1,42
	LT	171,118 ± 3,264	155,670 ± 4,209 <sup>###</sup>	6,36	0,0002	1,37
Powierzchnia śladu [pix. <sup>2</sup> ]	PP	161,312 ± 5,398	146,186 ± 10,577	1,08	0,3105	0,60
	LP	163,578 ± 7,316	142,271 ± 11,900	1,39	0,2010	0,72
	PT	181,785 ± 9,019	167,481 ± 11,729	1,76	0,1161	0,46
	LT	165,018 ± 10,368	198,390 ± 10,238 <sup>#</sup>	-3,23	0,0120	1,08
Rozstaw kończyn [pix.]	PŁ	13,233 ± 0,596	13,107 ± 0,951	0,15	0,8875	0,05
	TŁ	27,740 ± 1,127	23,960 ± 1,004 <sup>#</sup>	2,90	0,0199	1,18

PP – prawa przednia łapa, LP – lewa przednia łapa, PT – prawa tylna łapa, LT – lewa tylna łapa, PŁ – przednie łapy, TŁ – tylne łapy; pix. – piksele. Dane przedstawione są w postaci: średnie ± błąd standardowy średniej (SEM). <sup>#</sup> p < 0,05; <sup>##</sup> p < 0,01; <sup>###</sup> p < 0,001 (test t-Studenta dla pomiarów powtarzanych)

Zmiany te były wynikiem istotnego (p < 0,001) wydłużenia czasu trwania cyklu kroku o ~50% dla wszystkich czterech łap w porównaniu z ich wartościami kontrolnymi, a bardziej

szczegółowo: wydłużeniem zarówno fazy podporu, jak i czasu i prędkości przeniesienia kończyny.

Wśród badanych parametrów przestrzennych – jedynie długość kroku uległa znacznemu skróceniu, średnio o 10% dla każdej łapy (Tabela 6). Zaburzenia chodu widoczne były również po stronie ciała przeciwległej do półkuli mózgu z uszkodzeniem niedokrwiennym. Podobnie jak u szczurów szczepu SD, niedokrwienie/reperfuzja mózgu wywarło najsilniejszy wpływ na parametry czasowe chodu – wskaźniki wielkości efektu d-Cohena osiągnęły najwyższe wartości w zakresie parametrów czasowych (zakres: 0,42 do 3,65; średnia wartość = 2,30) w porównaniu z parametrami przestrzennymi (zakres: 0,05 do 1,63; średnia wartość = 0,93), jak zestawiono w Tabeli 6.

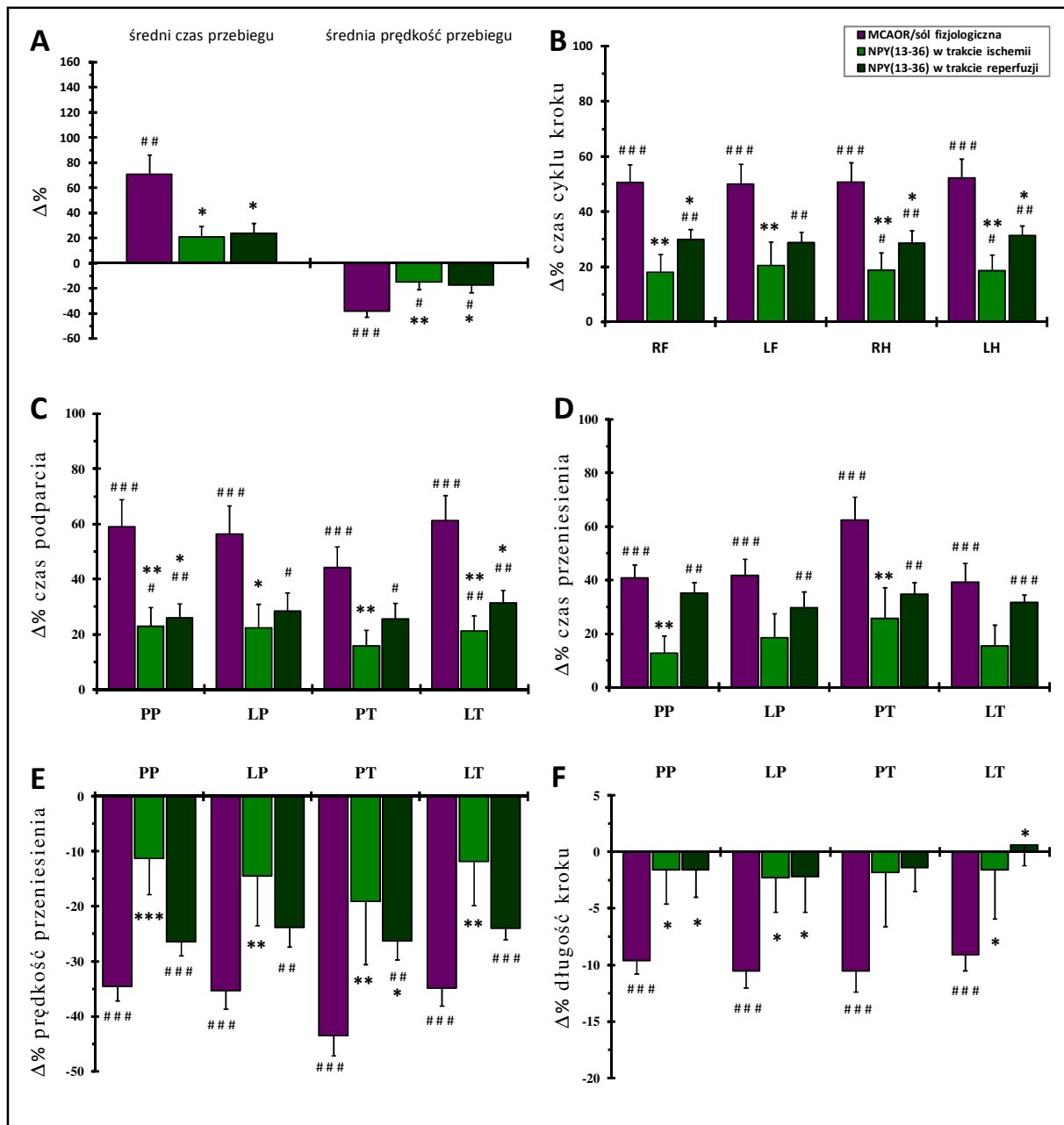


**Rycina 19.** Wyniki testu CatWalk, przykładowe wizualizacje przebiegów szczurów SHR z trzech grup; od góry do dołu: grupa kontrolna, grupa z NPY(13-36) podanym w trakcie niedokrwienia mózgu, grupa z NPY(13-36) podanym w trakcie reperfuzji. **Panele A, C, E** – przebiegi przed niedokrwieniem; **panele B, D, F** – przebiegi 72 godziny po reperfuzji. Strzałka oznacza kierunek ruchu, na szarych częściach panelu odległość między pionowymi, przerywanymi liniami oznacza interwał czasowy 1 s. W grupie kontrolnej widoczne dla wszystkich łap silne skrócenie długości kroku oraz spadek liczby kroków stawianych w jednostce czasu. W grupach, którym podawano NPY(13-36) widoczna częściowa normalizacja obu parametrów w stosunku do przebiegu przed niedokrwieniem.

NPY(13-36) poprawił wybrane parametry chodu w obu grupach szczurów szczepu SHR – zarówno po podaniu w czasie niedokrwienia jak i podczas reperfuzji (Rycina 19 i 20). Czas przebiegu istotnie skrócił się w obu grupach w porównaniu ze wzrostem tego parametru odnotowanym w grupie kontrolnej ( $F(2, 17) = 4,77$ ;  $p < 0,05$ ), a średnia prędkość chodu znacząco wzrosła ( $F(2, 17) = 6,09$ ;  $p < 0,05$ ). U szczurów z NPY(13-36), podanym w fazie niedokrwienia czas trwania cyklu kroku istotnie zmniejszył się dla wszystkich łap ( $F(2, 17) =$



7,28;  $p < 0,01$ ) dla PP; ( $F(2, 17) = 4,72$ ;  $p < 0,01$ ) dla LP; ( $F(2, 17) = 6,66$ ;  $p < 0,01$ ) dla PT; ( $F(2, 17) = 8,07$ ;  $p < 0,01$ ) dla LT, a u szczurów z NPY(13-36) podanym w trakcie reperfuzji



**Rycina 20.** Wpływ agonisty receptorów Y2 – NPY(13-36) na parametry chodu w teście CatWalk u szczurów SHR 72 godziny po reperfuzji mózgu ( $n = 5 - 9$  szczurów na grupę). Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM zmiany procentowe ( $\Delta\%$ ) między chodem przed niedokrwieniem i po. #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,01$  i ###  $p < 0,001$  (różnice wewnątrzgrupowe, test t-Studenta dla pomiarów powtarzanych); \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $P < 0,001$  vs grupa kontrolna (jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc LSD Fisher'a). PP – prawa przednia łapa, LP – lewa przednia łapa, PT – prawa tylna łapa, LT – lewa tylna łapa.

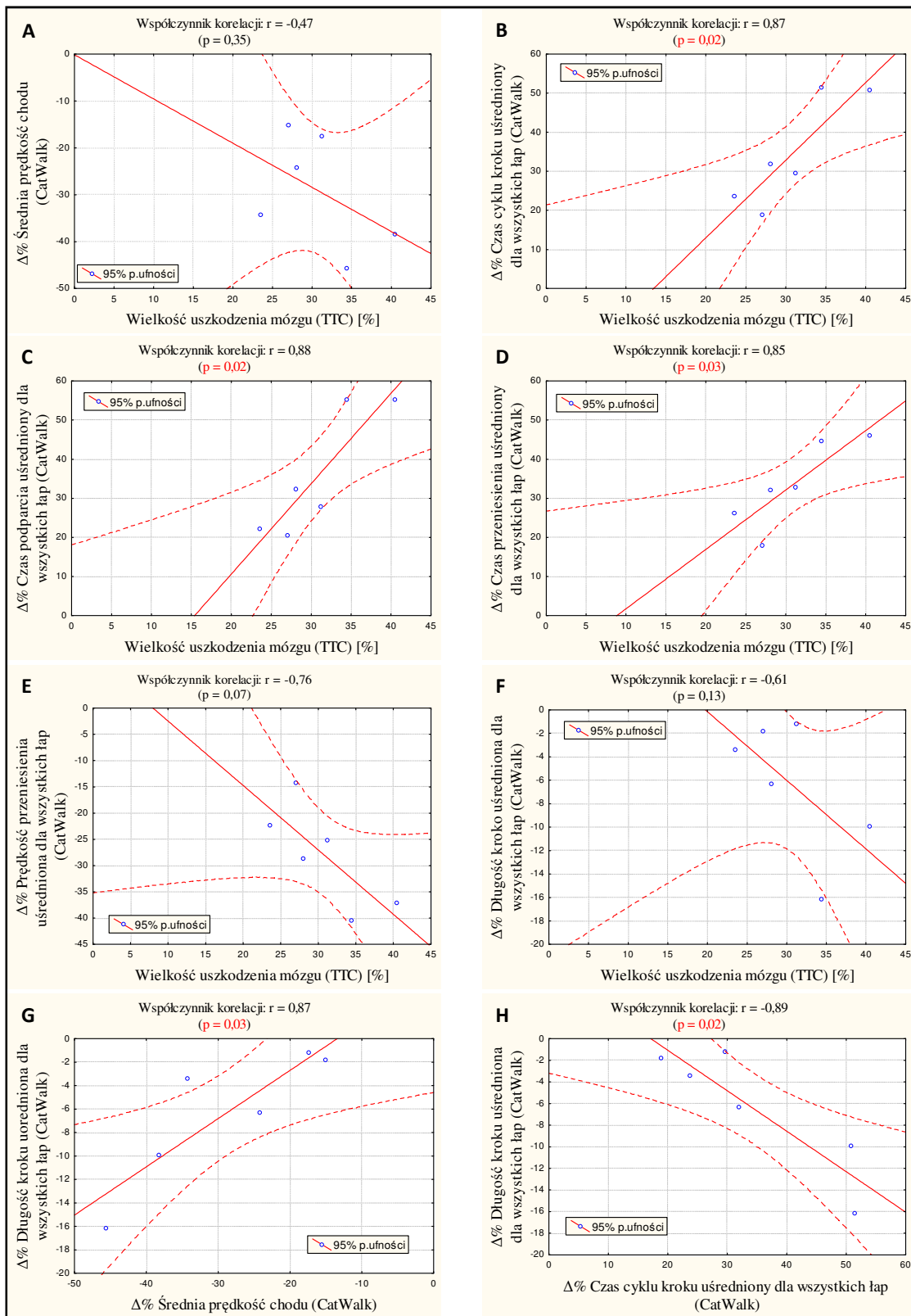
dla trzech łap ( $F(2, 17) = 7,28$ ;  $p < 0,05$ ) dla PP; ( $F(2, 17) = 4,72$ ;  $p = 0,065$ ) dla LP; ( $F(2, 17) = 6,66$ ;  $p < 0,05$ ) dla PT; ( $F(2, 17) = 8,07$ ;  $p < 0,05$ ) dla LT, w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w grupie kontrolnej.

U szczurów traktowanych NPY(13-36) 30 minut po rozpoczęciu okluzji MCA lub 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji, długość kroku znacząco wzrosła w porównaniu ze spadkiem obserwowanym w grupie kontrolnej ( $F(2, 17) = 5,37$ ;  $p < 0,05$ ) dla PP; ( $F(2, 17) = 4,58$ ;  $p < 0,05$ ) dla LP; ( $F(2, 17) = 3,22$ ;  $p = 0,065$ ) dla PT; ( $F(2, 17) = 4,13$ ;  $p < 0,05$ ) dla LT.

Zmiany opisanych powyżej parametrów są najbardziej precyzyjne dla tego badania i co najważniejsze wskazują na poprawę chodu po zastosowaniu NPY(13-36) w obu ustalonych punktach czasowych przebiegu ogniskowego niedokrwienia mózgu/reperfuzji. Czas faz składowych cyklu kroku wykazywał zmienne różnice międzygrupowe: faza podporu ( $F(2, 17) = 5,68$ ;  $p < 0,05$ ) dla PP; ( $F(2, 17) = 4,02$ ;  $p < 0,05$ ) dla LP; ( $F(2, 17) = 4,67$ ;  $p < 0,05$ ) dla PT; ( $F(2, 17) = 7,51$ ;  $p = 0,01$ ) dla LT, faza przeniesienia ( $F(2, 17) = 7,81$ ;  $p < 0,01$ ) dla PP; ( $F(2, 17) = 2,91$ ;  $p = 0,082$ ) dla LP; ( $F(2, 17) = 4,81$ ;  $p < 0,05$ ) dla PT; ( $F(2, 17) = 3,13$ ;  $p = 0,07$ ) dla LT. Prędkość przeniesienia znacznie wzrosła dla wszystkich łap u szczurów, którym podawano NPY(13-36) 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia, jednak u zwierząt traktowanych NPY(13-36) 30 minut po rozpoczęciu reperfuzji znamienne poprawę odnotowano tylko dla łapy prawej tylnej ( $F(2, 17) = 10,20$ ;  $p < 0,01$ ) dla PP; ( $F(2, 17) = 5,56$ ;  $p < 0,05$ ) dla LP; ( $F(2, 17) = 6,65$ ;  $p < 0,01$ ) dla PT; ( $F(2, 19) = 6,53$ ;  $p < 0,01$ ) dla LT.

#### ***4.4.3. Analiza korelacji pomiędzy zmianami parametrów chodu i wielkością uszkodzenia mózgu, u szczurów szczepu SD i SHR***

Wyniki analizy wskazują na statystycznie istotną ( $p < 0,05$ ) i silną (współczynnik korelacji Pearson'a  $\sim 0,9$ ) dodatnią korelację pomiędzy wielkością uszkodzenia mózgu i zmianą czasu cyklu kroku; czasu podparcia łapą (wraz ze zmniejszaniem wielkości uszkodzenia, skraca się czas podparcia łapą) oraz czasu przeniesienia łapy (wraz ze zmniejszaniem wielkości uszkodzenia, skraca się czas przeniesienia łapy), Rycina 21 A – F. Wraz ze zmniejszaniem wielkości uszkodzenia, skraca się czas powyższych parametrów czasowych. Brak jest natomiast korelacji pomiędzy wielkością uszkodzenia mózgu a zmianą prędkości chodu oraz długości kroku i prędkości przeniesienia łapy (Rycina 21 G – H).



**Rycina 21.** Wyniki analizy korelacji (współczynnik korelacji liniowej Pearson'a pomiędzy zmianami parametrów chodu i wielkością poniedokrwiennego uszkodzenia mózgu (**panele A – F**) oraz korelacji pomiędzy zmianą długości kroku i: zmianą prędkości chodu, zmianą czasu cyklu kroku (**panele G i H**). Do analizy włączono: wszystkie grupy szczurów z niedokrwieniem mózgu, szczepy SD i SHR. Analiza miała na celu oszacowanie potencjalnych zależności pomiędzy terapeutycznym zmniejszeniem uszkodzenia mózgu i zmniejszeniem zmian parametrów chodu, 72 godziny po reperfuzji mózgu.

#### 4.4.4. Zmiany aktywności ruchowej u szczurów szczepu SD i SHR w teście otwartego pola

Mobilność szczurów SD w otwartym polu drastycznie spadła 72 godziny po niedokrwieniu i reperfuzji mózgu (Tabela 7). Szczury podczas 10-minutowego testu spędzały większość czasu na środku areny. Całkowita przebyta droga zmniejszyła się z  $4034,3 \pm 78,3$  do  $837,1 \pm 236,8$  cm ( $t(5) = 4,33$ ;  $p < 0,01$ ), czas chodzenia zmniejszył się z  $321,4 \pm 59,1$  do  $86,2 \pm 19,0$  s ( $t(5) = 4,27$ ;  $p < 0,01$ ) oraz prędkość ruchu obniżona z  $6,7 \pm 1,3$  do  $1,4 \pm 0,4$  cm/s ( $t(5) = 4,31$ ;  $p < 0,01$ ).

**Tabela 7.** Wpływ niedokrwienia i reperfuzji na wybrane parametry aktywności ruchowej szczurów SD i SHR w grupach kontrolnych.

Parametr aktywności ruchowej	Przed MCAOR Średnia $\pm$ SEM	72 h po MCAOR Średnia $\pm$ SEM	t (t-test)	p	Wielkość efektu d Cohen'a
<b>Szczury SD (n = 6)</b>					
Całkowita droga [cm]	$4034,3 \pm 787,3$	$837,1 \pm 236,8^{##}$	4,33	0,0075	2,71
Czas chodu [s]	$321,4 \pm 59,1$	$86,2 \pm 19^{##}$	4,27	0,0080	2,19
Prędkość chodu [cm/s]	$6,7 \pm 1,3$	$1,3 \pm 0,4^{##}$	4,31	0,0077	2,26
<b>Szczury SHR (n = 9)</b>					
Całkowita droga [cm]	$3390,4 \pm 157,0$	$1208,7 \pm 259,0^{###}$	8,06	0,00004	3,40
Czas chodu [s]	$366,1 \pm 8$	$134,2 \pm 26^{###}$	9,20	0,00002	4,05
Prędkość chodu [cm/s]	$5,65 \pm 0,3$	$2,01 \pm 0,4^{###}$	8,07	0,00004	3,39

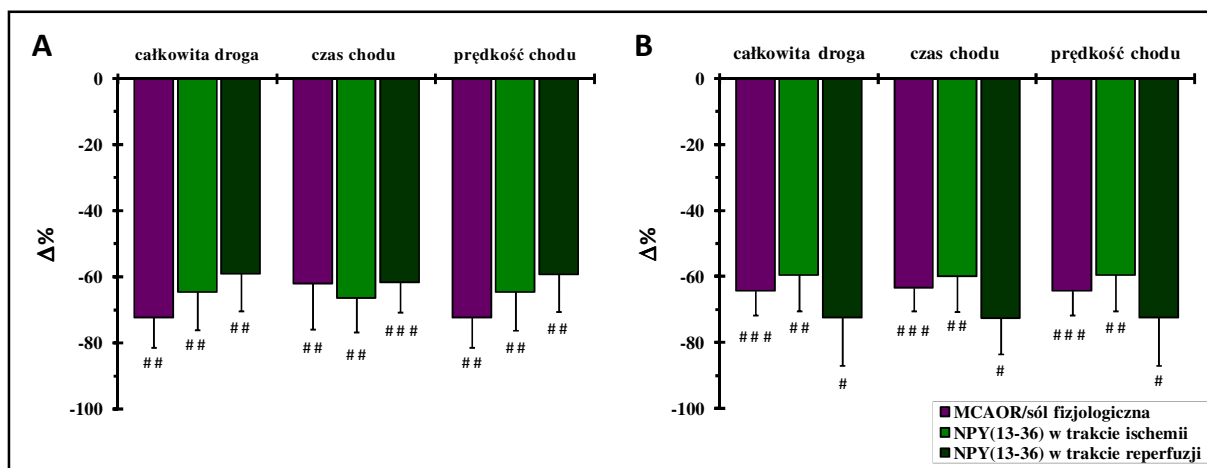
<sup>##</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>###</sup>  $p < 0,001$  (test t-Studenta dla pomiarów powtarzanych)

Agonista receptorów Y2 – NPY(13-36) nie poprawił spontanicznej aktywności ruchowej szczurów SD, mierzonej w teście otwartego pola (Rycina 22 A). W grupie szczurów z NPY(13-36) podanym w trakcie niedokrwienia, całkowita przebyta droga zmniejszyła się z  $4668,9 \pm 235,5$  cm do  $1626,0 \pm 507,4$  cm ( $t(5) = 5,28$ ;  $p < 0,005$ ), czas chodzenia zmniejszył się z  $408,4 \pm 13,4$  s do  $138,2 \pm 41,9$  s ( $t(5) = 6,72$ ;  $p < 0,005$ ), a prędkość chodu obniżyła się z  $7,8 \pm 0,4$  do  $2,7 \pm 0,8$  cm/s ( $t(5) = 5,26$ ;  $p < 0,005$ ).

W grupie szczurów SD, którym NPY(13-36) podano w fazie reperfuzji także nie odnotowano poprawy mobilności w teście otwartego pola. Całkowita przebyta droga zmniejszyła się z  $5010,1 \pm 407,9$  do  $2211,6 \pm 728,0$  cm ( $t(6) = 5,55$ ;  $p < 0,005$ ), czas ruchu skrócił się z  $412,1 \pm 15,3$  do  $163,3 \pm 41,1$  s ( $t(6) = 7,33$ ;  $p < 0,001$ ) a prędkość poruszania się zmniejszyła się z  $8,4 \pm 0,7$  do  $3,7 \pm 1,2$  cm/s ( $t(6) = 5,57$ ;  $p < 0,005$ ).

Analiza danych z testu otwartego pola u szczurów SHR wykazała podobne zmiany jak u szczurów SD. Mobilność szczurów SHR w grupie kontrolnej zmniejszyła się znacząco 72 godziny po reperfuzji. Jak pokazano w Tabeli 7, w grupie kontrolnej całkowita przebyta droga, czas chodzenia, prędkość chodu uległy znacznemu zmniejszeniu, odpowiednio o około 64, 63, 64% w porównaniu z wartościami tych parametrów przed niedokrwieniem.

Nie odnotowano międzygrupowych różnic w wartościach zmian poszczególnych parametrów, zatem NPY(13-36) nie poprawił mobilności w żadnej z grup eksperymentalnych SHR (jednoczynnikowa ANOVA,  $F(2, 17) = 0,34$ ;  $p = 0,72$ ;  $F(2, 17) = 0,43$ ;  $p = 0,66$ ;  $F(2, 17) = 0,34$ ,  $p = 0,72$ ;  $F(2,17) = 0,18$ ;  $p = 0,84$ , odpowiednio dla każdego parametru; Rycina 22 B).



**Rycina 22.** Wpływ NPY(13-36) u szczurów SD - **panel A** ( $n = 5 - 7$  szczurów na grupę) i SHR - **panel B** ( $n = 5 - 9$  szczurów na grupę), poddanych zamknięciu MCA i reperfuzji oraz procedurze SHAM, na parametry aktywności lokomotorycznej w 10-minutowym teście otwartego pola, 72 godziny po rozpoczęciu reperfuzji. Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM zmiany procentowe ( $\Delta\%$ ) między wynikami przed niedokrwieniem i 72 godziny po reperfuzji; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  (różnice wewnątrzgrupowe, test *t*-Studenta dla pomiarów powtarzanych).

#### 4.5. Zaburzenia regulacji mikrokrążenia w strefie półciaenia ischemicznego u szczurów szczepu SD 24 godziny po reperfuzji mózgu, wpływ NPY(13-36)

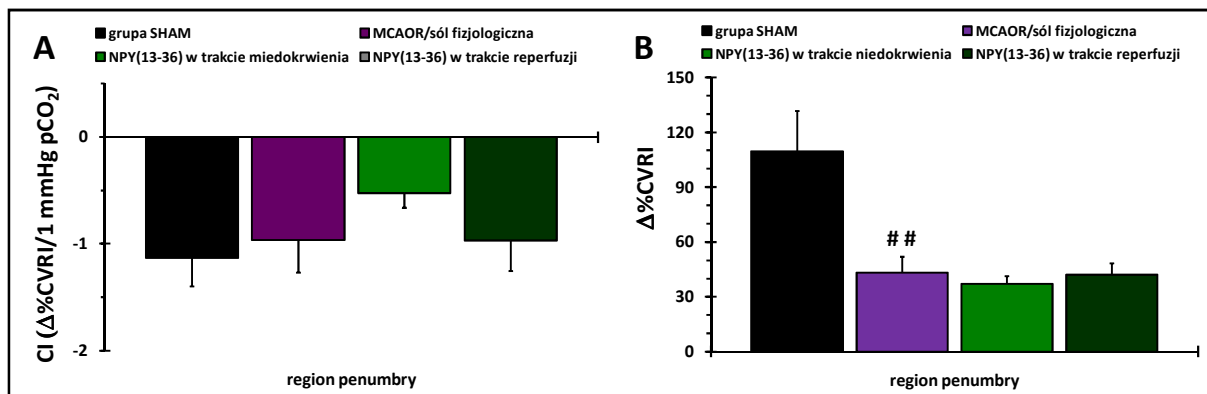
W Tabeli 8 zestawiono wartości średniego ciśnienia tętniczego krwi (MABP) oraz ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla (pCO<sub>2</sub>) i pH krwi tętniczej we wszystkich grupach szczurów SD, poddanych testowi na hiperkapnię. MABP nie różniło się istotnie między grupami ani nie wykazywało istotnych zmian w trakcie testu. Zaobserwowano, że poziom pCO<sub>2</sub> istotnie wzrósł, a pH krwi istotnie zmalało w 6 minucie inhalacji 5% CO<sub>2</sub> we wszystkich grupach (p < 0,001 vs wartość przed podaniem 5% CO<sub>2</sub>), parametry te ulegały normalizacji po 15 minutach od zakończenia inhalacji CO<sub>2</sub>.

**Tabela 8.** Parametry fizjologiczne (średnie ciśnienie tętnicze krwi i gazometria) mierzone podczas inhalacji 5% CO<sub>2</sub> u szczurów SD. Dane zostały przedstawione jako średnie ± SEM.

Grupa i faza eksperymentu	MABP [mmHg]	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pH
<b>Grupa SHAM (n = 9)</b>			
2 minuta przed inhalacją 5% CO <sub>2</sub>	120 ± 5	33,22 ± 2,01	7,49 ± 0,02
6 minuta inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	115 ± 4	56,33 ± 2,50 <sup>###</sup>	7,31 ± 0,01 <sup>###</sup>
15 minuta po inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	115 ± 5	34,44 ± 1,93 <sup>***</sup>	7,48 ± 0,02 <sup>***</sup>
<b>MCAOR/sól fizjologiczna (n = 7)</b>			
2 minuta przed inhalacją 5% CO <sub>2</sub>	109 ± 5	29,43 ± 1,32	7,50 ± 0,02
6 minuta inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	106 ± 3	51,14 ± 1,68 <sup>###</sup>	7,32 ± 0,02 <sup>###</sup>
15 minuta po inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	106 ± 4	31,29 ± 0,89 <sup>***</sup>	7,47 ± 0,01 <sup>***</sup>
<b>NPY(13-36) w trakcie MCAO (n = 6)</b>			
2 minuta przed inhalacją 5% CO <sub>2</sub>	110 ± 3	29,17 ± 2,29	7,51 ± 0,02
6 minuta inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	109 ± 4	57,67 ± 5,45 <sup>###</sup>	7,28 ± 0,04 <sup>###</sup>
15 minuta po inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	106 ± 4	30,17 ± 1,17 <sup>***</sup>	7,46 ± 0,01 <sup>***</sup>
<b>NPY(13-36) w trakcie reperfuzji (n = 6)</b>			
2 minuta przed inhalacją 5% CO <sub>2</sub>	108 ± 5	32,67 ± 1,12	7,46 ± 0,01
6 minuta inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	107 ± 3	51,67 ± 3,45 <sup>###</sup>	7,33 ± 0,01 <sup>###</sup>
15 minuta po inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	98 ± 4	34,67 ± 1,15 <sup>***</sup>	7,45 ± 0,01 <sup>***</sup>

MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; <sup>###</sup> p < 0,001 vs Przed CO<sub>2</sub>; <sup>\*\*\*</sup> p < 0,001 vs w czasie inhalacji CO<sub>2</sub> (MANOVA dla pomiarów powtarzanych; post hoc test Tukey'a)

Podczas eksperymentu z dożylnym podaniem L-NAME, MABP wzrosło znacząco, o około 50% ( $p < 0,001$ ) w stosunku do wartości wyjściowej i utrzymywało się na tym poziomie przez 30 minut obserwacji (dane nie przedstawione).



**Rycina 23.** Wpływ NPY(13-36) u szczurów SD ( $n = 6 - 9$  szczurów na grupę) na odpowiedź mikrokrążenia w regionie penumbry na podanie 5%  $CO_2$  i L-NAME 24 godziny po rozpoczęciu reperfuzji. **Panel A** – zmiana procentowa wskaźnika oporu naczyniowego ( $\Delta\%CVRI$ ) na 1 mmHg  $pCO_2$ , w 6 minucie inhalacji 5%  $CO_2$ , **Panel B** – zmiana procentowa CVRI w 30 minucie po dożylnym podaniu L-NAME (30 mg/kg/0,3 ml soli fizjologicznej).  $\Delta\%CVRI$  – zmiana procentowa CVRI vs poziom przed zadziałaniem bodźca. Dane zostały przedstawione jako średnie  $\pm$  SEM; <sup>##</sup>  $p < 0,01$  vs grupa SHAM (jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc LSD Fisher'a).

Rycina 23 A i B, przedstawia zmiany CVRI w regionie penumbry w odpowiedzi na hiperkapnię i dożylne podanie L-NAME. MCAOR nie wywarło istotnego statystycznego wpływu na odpowiedź mikrokrążenia na hiperkapnię w obszarze penumbry. Obniżenie indeksu chemicznego (CI) w odpowiedzi na indukowaną hiperkapnię nie różniło się pomiędzy grupami (jednoczynnikowa ANOVA,  $F(3, 24) = 0,89$ ;  $p = 0,46$ ; panel A), co świadczy o braku wpływu niedokrwienia/reperfuzji na regulację chemiczną mikrokrążenia w obszarze penumbry. Wykryto natomiast istotną zmienność międzygrupową w odpowiedziach oporu naczyniowego na podanie L-NAME ( $F(3, 24) = 5,90$ ;  $p < 0,01$ ). Istotnie słabszą odpowiedź mikrokrążenia w obszarze penumbry na podanie L-NAME stwierdzono w grupie kontrolnej szczurów z MCAOR w porównaniu z grupą SHAM ( $p < 0,01$ ; Rycina 23 B). Podanie NPY(13-36), zarówno 30 minut po MCAO jak i 30 minut po reperfuzji, nie poprawiło tej odpowiedzi.

#### 4.6. Zaburzenia regulacji mikrokrążenia w strefie półcienia ischemicznego u szczurów szczepu SHR 24 godziny po reperfuzji mózgu, wpływ NPY(13-36)

W Tabeli 9 zestawiono wartości średniego ciśnienia tętniczego krwi, oraz pCO<sub>2</sub> i pH krwi tętniczej we wszystkich grupach szczurów SHR, poddanych testowi na hiperkapnię. MABP nie różniło się między grupami ani nie wykazywało znaczących zmian w trakcie testu, natomiast poziom pCO<sub>2</sub> istotnie wzrósł, a pH krwi istotnie zmalało w 6 minucie inhalacji 5% CO<sub>2</sub> we wszystkich grupach (p < 0,001 vs wartość przed wywołaniem hiperkapnii) i powracały do wartości normokapnicznych po 15 minutach od zakończenia inhalacji CO<sub>2</sub>. Podczas eksperymentu z dożylnym podaniem L-NAME, MABP wzrosło znacząco, o około 85% (p < 0,01) w stosunku do wartości wyjściowej i utrzymywało się na tym poziomie przez 30 minut obserwacji (dane nie przedstawione).

**Tabela 9.** Parametry fizjologiczne (średnie ciśnienie tętnicze krwi i gazometria) mierzone w trakcie eksperymentu inhalacji 5% CO<sub>2</sub> u szczurów SHR. Dane zostały przedstawione jako średnie ± SEM.

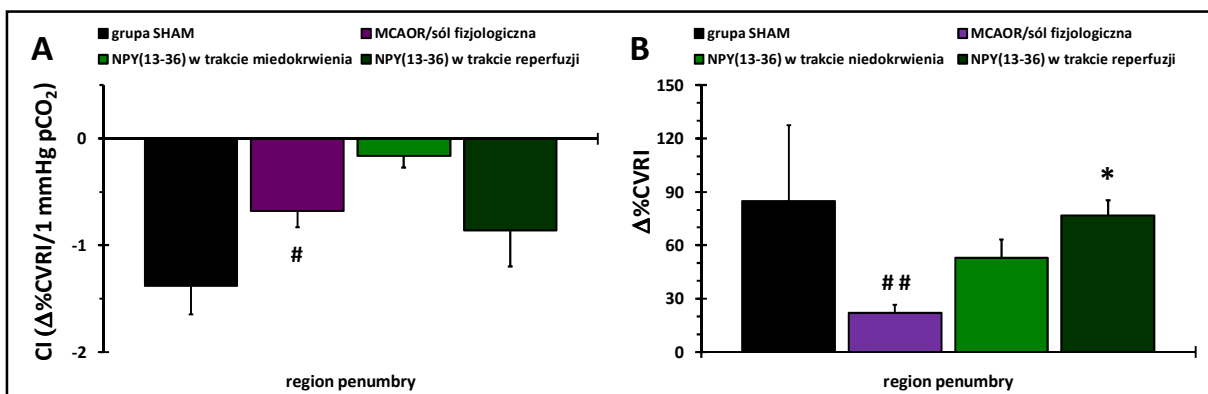
Grupa i faza eksperymentu	MABP [mmHg]	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pH
<b>Grupa SHAM (n = 7)</b>			
2 minuta przed inhalacją 5% CO <sub>2</sub>	127 ± 9	36,24 ± 0,82	7,44 ± 0,01
6 minuta inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	131 ± 6	54,26 ± 2,68 <sup>###</sup>	7,31 ± 0,03 <sup>###</sup>
15 minuta po inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	108 ± 12	35,93 ± 1,06 <sup>***</sup>	7,45 ± 0,01 <sup>***</sup>
<b>MCAOR/sól fizjologiczna (n = 8)</b>			
2 minuta przed inhalacją 5% CO <sub>2</sub>	106 ± 4	33,90 ± 0,95	7,46 ± 0,02
6 minuta inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	116 ± 3	52,99 ± 1,56 <sup>###</sup>	7,32 ± 0,02 <sup>###</sup>
15 minuta po inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	99 ± 5	33,80 ± 1,11 <sup>***</sup>	7,48 ± 0,01 <sup>***</sup>
<b>NPY(13-36) w trakcie MCAO (n = 5)</b>			
2 minuta przed inhalacją 5% CO <sub>2</sub>	128 ± 8	34,20 ± 0,86	7,48 ± 0,01
6 minuta inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	124 ± 5	54,40 ± 3,41 <sup>###</sup>	7,33 ± 0,03 <sup>###</sup>
15 minuta po inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	110 ± 5	37,00 ± 1,55 <sup>***</sup>	7,47 ± 0,02 <sup>***</sup>
<b>NPY(13-36) w trakcie reperfuzji (n = 6)</b>			
2 minuta przed inhalacją 5% CO <sub>2</sub>	110 ± 5	33,03 ± 3,22	7,49 ± 0,04
6 minuta inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	109 ± 6	47,65 ± 2,51 <sup>###</sup>	7,34 ± 0,03 <sup>###</sup>
15 minuta po inhalacji 5% CO <sub>2</sub>	98 ± 6	33,55 ± 3,15 <sup>***</sup>	7,49 ± 0,03 <sup>***</sup>

MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; <sup>###</sup> p < 0,001 vs Przed CO<sub>2</sub>; <sup>\*\*\*</sup> p < 0,001 vs w czasie inhalacji CO<sub>2</sub> (MANOVA dla pomiarów powtarzanych; post hoc test Tukey'a)



Rycina 24 A i B przedstawia wyniki badania odpowiedzi LDF w regionie penumbry, na hiperkapnię i dożylne podanie L-NAME. Jednoczynnikowa ANOVA wykazała istotną zmienność międzygrupową w odpowiedziach CVR na indukowaną hiperkapnię ( $F(3, 22) = 4,14$ ;  $p < 0,05$ ). Istotnie niższy CI stwierdzono w grupie kontrolnej, w porównaniu z grupą SHAM ( $p < 0,05$ ). Żaden z wariantów czasowych podania NPY(13-36) nie poprawił upośledzonej odpowiedzi na hiperkapnię (Rycina 24 A). NPY(13-36) podany w czasie niedokrwienia wydaje się nawet pogarszać odpowiedź na hiperkapnię, ale wynik ten nie osiągnął istotności statystycznej.

Zaobserwowano także istotne różnice międzygrupowe w reakcji mikrokrążenia na podanie L-NAME ( $F(3, 22) = 4,00$ ;  $p < 0,05$ ). Podobnie jak w przypadku hiperkapni, w grupie kontrolnej odnotowano mniejszą odpowiedź na podanie L-NAME w porównaniu z grupą SHAM ( $p < 0,01$ ; Rycina 24 B). NPY(13-36), podany podczas reperfuzji przywrócił reakcję mikrokrążenia na L-NAME rejonie penumbry ( $p < 0,05$  vs grupa kontrolna).

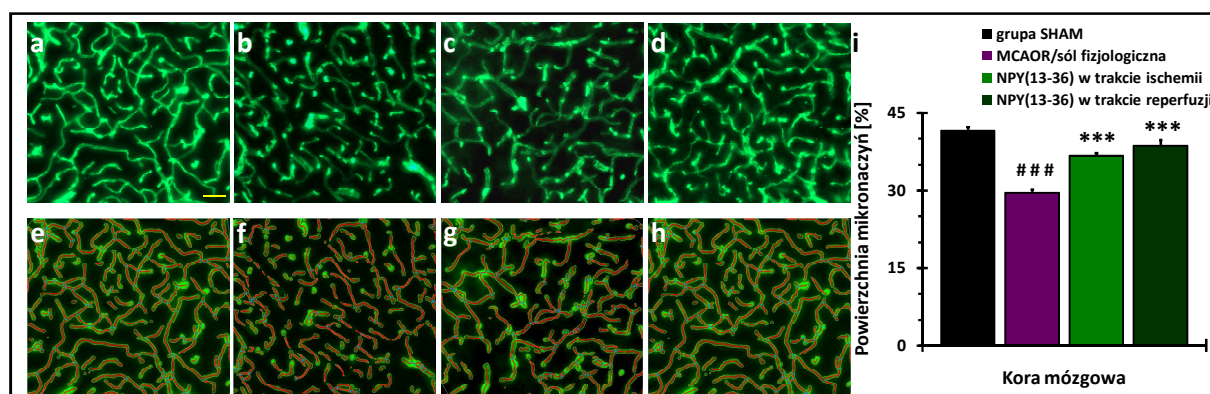


**Rycina 24.** Wpływ NPY(13-36) u szczurów SHR ( $n = 5 - 8$  szczurów w grupie) na odpowiedź mikrokrążenia w obszarze penumbry na podanie 5% CO<sub>2</sub> i L-NAME 24 godziny po rozpoczęciu reperfuzji. **Panel A** – zmiana procentowa CVRI/1 mmHg pCO<sub>2</sub> w 6 minucie inhalacji 5% CO<sub>2</sub>, **Panel B** – zmiana procentowa CVRI w 30 minucie po dożylnym podaniu L-NAME (30 mg/kg/0,3 ml soli fizjologicznej). Δ%CVRI – zmiana procentowa CVRI vs poziom przed zadziałaniem bodźca. Dane zostały przedstawione jako średnie ± SEM; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  vs grupa SHAM; \*  $p < 0,05$  w porównaniu z grupą kontrolną (jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc LSD Fisher'a).

#### 4.7. Wpływ NPY(13-36) na gęstość naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej u szczurów szczepu SD i SHR 72 godziny po reperfuzji mózgu

##### 4.7.1. Wpływ NPY(13-36) na gęstość naczyń mikrokrążenia u szczurów szczepu SD

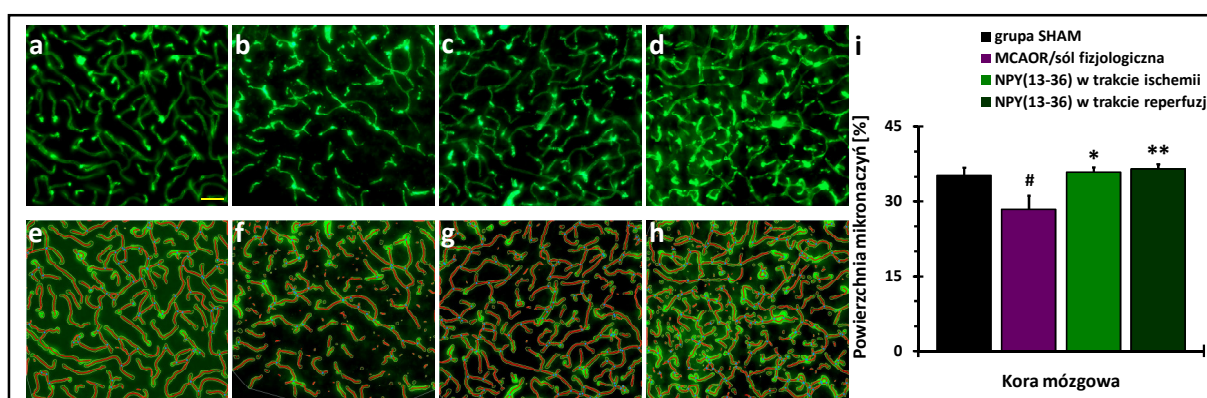
Na Rycinie 25 przedstawiono wyniki analizy porównawczej gęstości mikronaczyń w korze mózgowej szczurów SD (w strefie okołozawałowej, dokładna lokalizacja została opisana w metodyce): jednoczynnikowa ANOVA wykazała istotne zróżnicowanie międzygrupowe,  $F(3, 12) = 38,4$ ;  $p < 0,001$ . Mikrofotografie (Rycina 25 a - d) oraz histogram z wynikami analizy półilościowej (Rycina 25 i) uwidaczniają, że gęstość w grupie kontrolnej ( $29,6 \pm 0,7\%$ ) istotnie ( $p < 0,001$ ) zmniejszyła się 72 godziny po reperfuzji w porównaniu z grupą SHAM ( $41,6 \pm 0,7\%$ ). Podania NPY(13-36) w obu wariantach czasowych istotnie zachowały gęstość natywną mikronaczyń ( $p < 0,001$  vs grupa kontrolna).



**Rycina 25.** Wpływ podania NPY(13-36) u szczurów szczepu SD ( $n = 4$  szczury w każdej z grup) na procentową gęstość mikronaczyń w korze mózgowej 72 godziny po reperfuzji/procedurze SHAM. **Panele a - d** pokazują reprezentatywne mikrofotografie z immunofluorescencyjnego barwienia naczyń anty-RECA-1 (zielone); skrawki mózgu szczura o grubości  $60 \mu\text{m}$ , żółty pasek skali oznacza  $150 \mu\text{m}$  (**a** - grupa SHAM, **b** - grupa kontrolna, **c** - NPY(13-36) podany podczas niedokrwienia, **d** - NPY(13-36) podany podczas reperfuzji); **panele e - h** pokazują te same mikrofotografie (w odpowiadającej kolejności) analizowane w programie *AngioTool 0.6a* (National Cancer Institute, USA; Zudaire et al. 2011) - szkieletowa reprezentacja układu naczyniowego jest pokazana na czerwono. **Panel i** przedstawia wyniki analizy półilościowej procentowej powierzchni naczyń w układzie międzygrupowym. Wyniki analizy wskazują na istotne zmniejszenie gęstości mikronaczyń w grupie kontrolnej i jej istotne zachowanie w obu grupach traktowanych agonistą receptorów Y2. Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM; ###  $p < 0,001$  vs grupa SHAM; \*\*\*  $p < 0,001$  vs grupa kontrolna (jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc LSD Fisher'a). Zdjęcia mikroskopowe pochodzą z regionu kory czołowej (Rycina 10).

#### 4.7.2. Wpływ NPY(13-36) na gęstość naczyń mikrokrążenia u szczurów szczepu SHR

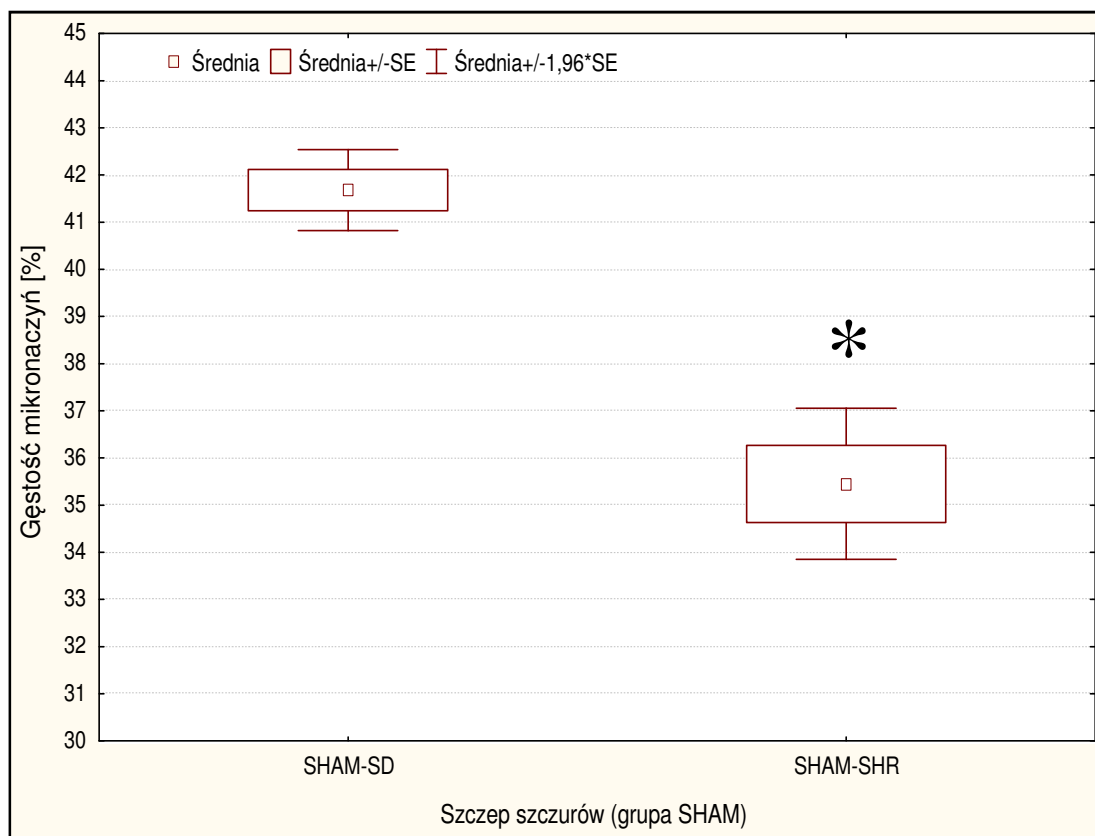
Na Rycinie 26 przedstawiono wyniki analizy porównawczej gęstości mikronaczyń w korze mózgowej szczurów SHR (w strefie okołozawałowej): jednoczynnikowa ANOVA wykazała istotne zróżnicowanie międzygrupowe,  $F(3, 12) = 3,9$ ;  $p < 0,05$ . Mikrofotografie (Rycina 26 a - d) oraz histogram analizy półilościowej (Rycina 26 i) wskazują, że gęstość w grupie kontrolnej ( $28,4 \pm 3\%$ ) istotnie ( $p < 0,05$ ) zmniejszyła się 72 godziny po reperfuzji w porównaniu z grupą SHAM ( $35,2 \pm 1,6\%$ ). Podania NPY(13-36) w obu wariantach czasowych istotnie zachowały gęstość natywną mikronaczyń (odpowiednio  $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$  vs grupa kontrolna).



**Rycina 26.** Wpływ podania NPY(13-36) u szczurów szczepu SHR ( $n = 4$  szczury w każdej z grup) na procentową gęstość mikronaczyń w korze mózgowej 72 godziny po niedokrwieniu i reperfuzji mózgu/SHAM. **Panele a - d** pokazują reprezentatywne mikrofotografie z immunofluorescencyjnego barwienia naczyń anty-RECA-1 (zielone); skrawki mózgu szczura o grubości  $60 \mu\text{m}$ , żółty pasek skali oznacza  $150 \mu\text{m}$  (**a** - grupa SHAM, **b** - grupa kontrolna, **c** - NPY(13-36) podczas niedokrwienia, **d** - NPY(13-36) podczas reperfuzji); **panele e - h** pokazują te same mikrofotografie (w odpowiadającej kolejności) analizowane w programie AngioTool 0.6a (National Cancer Institute, USA; Zudaire et al. 2011) - szkieletowa reprezentacja układu naczyniowego jest pokazana na czerwono. **Panel i** przedstawia wyniki analizy półilościowej procentowej powierzchni naczyń w układzie międzygrupowym. Wyniki analizy wskazują na istotne zmniejszenie gęstości mikronaczyń w grupie kontrolnej i jej istotne zachowanie w obu grupach traktowanych agonistą receptorów Y2. Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM; #  $p < 0,05$  vs grupa SHAM; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs grupa kontrolna (jednoczynnikowa ANOVA z testem post hoc LSD Fisher'a). Zdjęcia mikroskopowe pochodzą z regionu kory czołowej (Rycina 10).

#### 4.7.3. Różnice gęstości naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej pomiędzy szczepami SD i SHR

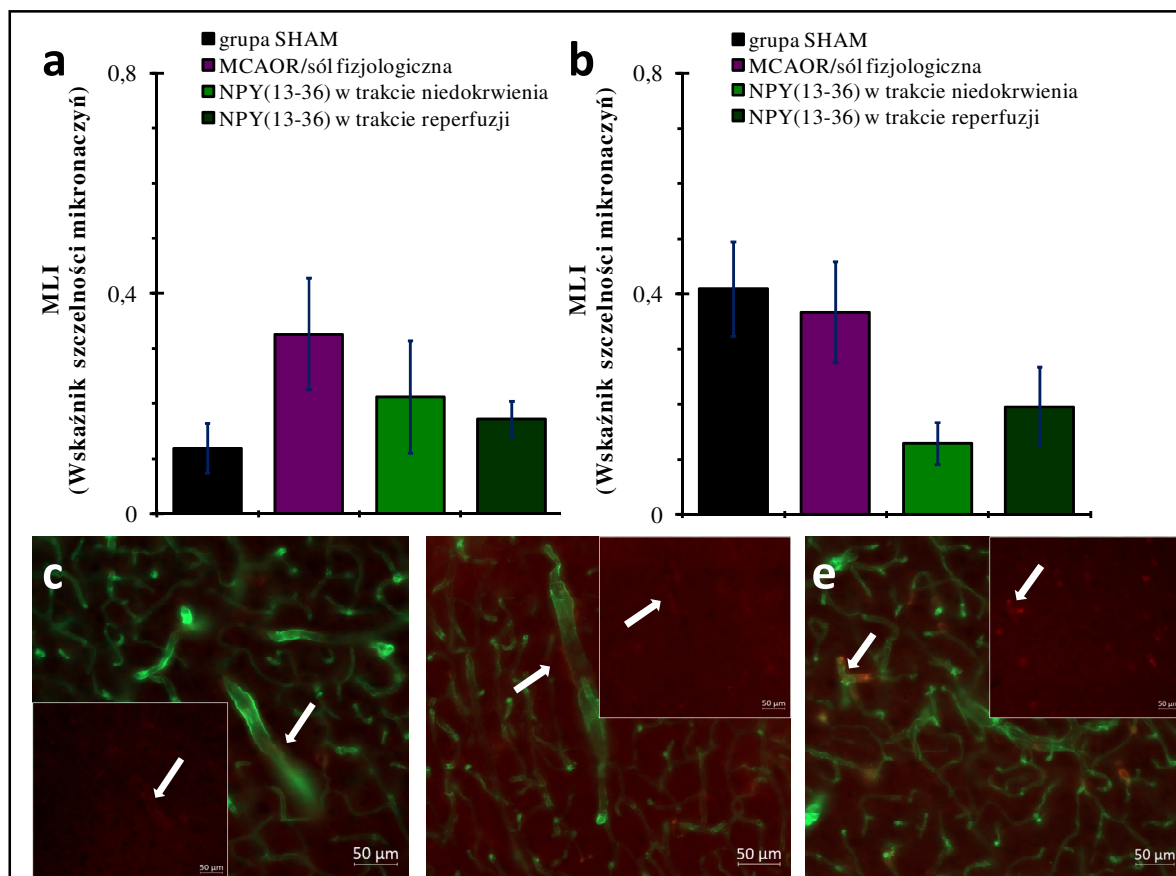
Na Rycinie 27 przedstawiono wyniki analizy porównawczej gęstości mikronaczyń w korze mózgowej szczurów z grupy SHAM, między szczepami SD i SHR. Test t-Studenta dla pomiarów niezależnych wykazał istotne zróżnicowanie międzygrupowe, ( $t(6) = 3,57$ ;  $p < 0,05$ ). Gęstość najmniejszych naczyń mikrokrążenia u szczepu SD była o 6,4% większa niż u szczepu SHR, odpowiednio:  $41,6 \pm 3,2$  i  $35,2 \pm 0,8\%$ .



**Rycina 27.** Zróżnicowanie gęstości najmniejszych naczyń mikrokrążenia kory mózgowej pomiędzy szczepami szczurów SD i SHR w obrębie grupy SHAM ( $n = 4$  szczury na grupę). Reprezentatywne mikrofotografie z immunofluorescencyjnego barwienia naczyń anty-RECA-1 (skrawki mózgu szczura o grubości  $60 \mu\text{m}$ ) analizowano w programie AngioTool 0.6a (National Cancer Institute, USA; Zudaire i wsp., 2011). Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM; test t-Studenta dla pomiarów niezależnych, \*  $p < 0,05$ .

#### 4.8. Wpływ NPY(13-36) na szczelność naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej 72 godziny po reperfuzji mózgu u szczurów szczepu SD i SHR

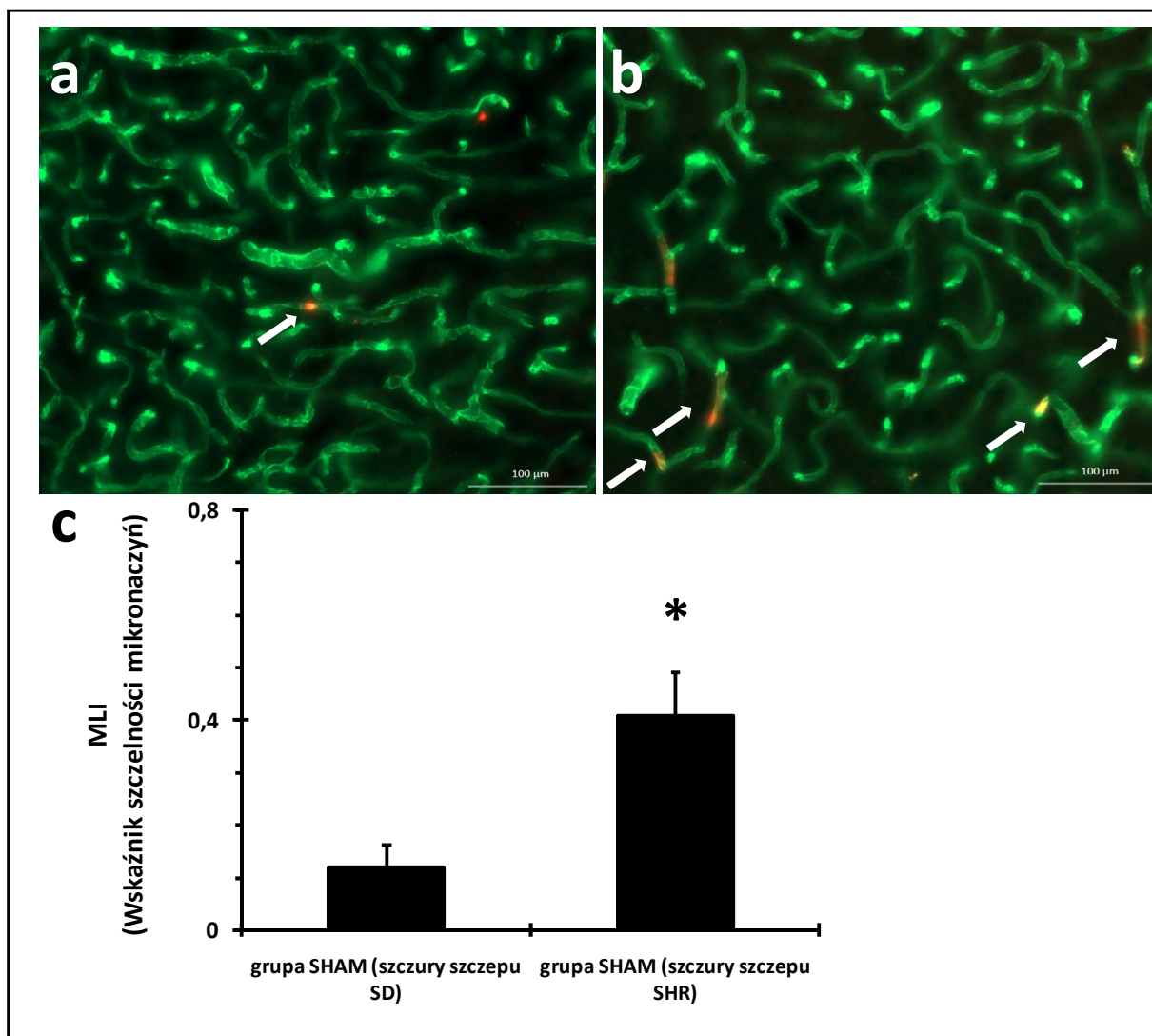
Badania przeprowadzone z użyciem przeciwciała przeciwko szczurzej immunoglobulinie IgG wykazały, że 72 godziny po reperfuzji mózgu w strefie okołozawałowej obserwuje się wyciek surowicy z podobnie dużej liczby naczyń mikrokrążenia u szczurów SD i SHR (Rycina 28). Jak wykazała analiza porównawcza, podanie NPY(13-36) nie zmniejszyło liczby przeciekających naczyń u żadnego ze szczepów (jednoczynnikowa ANOVA, SD: ( $F(3, 12) = 1,30$ ;  $p = 0,32$ ), SHR: ( $F(3, 12) = 3,24$ ;  $p = 0,06$ )), jednakże obserwowano wyraźną tendencję do ich zmniejszenia, szczególnie w przypadku szczurów SHR.



**Rycina 28.** Wpływ podania NPY(13-36) u szczurów szczepu SD i SHR ( $n = 4$  szczury w każdej grupie) na stopień przeciekania najmniejszych naczyń kory mózgowej w obszarze penumbry 72 godziny po reperfuzji mózgu. **Panel a** oraz **b** – wyniki kwantyfikacyjnej analizy porównawczej liczności przeciekających naczyń u szczepów SD (**a**) i SHR (**b**). Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM; jednoczynnikowa ANOVA. **Panele c - e** przedstawiają reprezentatywne mikrofotografie z immunofluorescencyjnego barwienia naczyń anti-RECA-1 (zielony) i przeciwciałem przeciwko szczurzym immunoglobulinom IgG (czerwony) u szczurów szczepu SHR. **Panel c** – grupa kontrolna, **d** – grupa z NPY(13-36) podanym w czasie niedokrwienia, **e** – grupa z NPY(13-36) podanym w czasie reperfuzji; strzałki wskazują na miejsca przeciekające; skrawki mózgu szczura o grubości 60  $\mu$ m. Zdjęcia mikroskopowe pochodzą z regionu kory czołowej (Rycina 10).

#### 4.8.1. Ocena szczelności naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej szczurów SHAM SD i SHAM SHR

Na Rycinie 29 przedstawiono wyniki oceny porównawczej stopnia przeciekania naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej szczurów z grupy SHAM, 72 godziny po pozorowanej reperfuzji. Analiza testem t-Studenta wykazała istotnie większą liczbę nieszczelnych mikronaczyń w grupie szczurów SHAM szczepu SHR; ( $t(5) = 3,00$   $p < 0,05$ ). Było ich około trzykrotnie więcej niż w grupie szczurów SHAM SD.



**Rycina 29.** Zróznicowanie stopnia przeciekania najmniejszych naczyń mikrokrążenia (bariery krew-mózg) w korze mózgowej, pomiędzy szczepami szczurów SD i SHR w obrębie grupy SHAM ( $n = 4$  szczury na grupę; skrawki mózgu szczura o grubości 60  $\mu\text{m}$ ), 72 godziny po pozorowanej reperfuzji. **Panel a** oraz **b** – reprezentatywne mikrofotografie z immunofluorescencyjnego barwienia naczyń anti-RECA-1 (zielony) i przeciwko szczurzym immunoglobulinom IgG (czerwony), odpowiednio u szczurów SD i SHR. Strzałki wskazują na miejsca przeciekające. **Panel c** – wyniki kwantyfikacyjnej analizy porównawczej liczności przeciekających miejsc w naczyniach, pomiędzy szczepami SD i SHR. Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM; test t-Studenta dla pomiarów niezależnych; \*  $p < 0,05$ . Zdjęcia mikroskopowe pochodzą z regionu kory czołowej (Rycina 10).

## 5. DYSKUSJA WYNIKÓW

### 5.1. Uzasadnienie wyboru modelu eksperymentalnego

Badania przeprowadziłem na szczurzym modelu niedokrwienia i reperfuzji mózgu, bazującym na czasowym zamknięciu światła tętnicy środkowej mózgu za pomocą wewnątrznaczyniowego filamentu [Longa i wsp., 1989]. Obecnie uważa się, że spośród dostępnych modeli niedokrwienia mózgu, ten odpowiada najlepiej udarowi zatorowemu mózgu u ludzi [Fluri i wsp., 2015].

Model ten charakteryzuje się obecnością strefy półcienia ischemicznego (penumbry), istnienie której potwierdzono za pomocą nieinwazyjnych technik obrazowania także u ludzi [del Zoppo i wsp., 2011]. Ponadto, w tym modelu w czasie niedokrwienia i wczesnej reperfuzji mózgu obserwuje się fale depolaryzacji okołozawałowych, będące jednym z ważniejszych procesów w kaskadzie mechanizmów prowadzących do powolnej śmierci neuronów penumbry i do permanentnego uszkodzenia tego obszaru. Kluczową rolę depolaryzacji okołozawałowych w progresji uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu potwierdzono też u pacjentów po udarze mózgu [Dreier, 2011; Zandt i wsp., 2013].

Ważnym aspektem wyboru tego modelu jest też fakt, że moment zamknięcia i reperfuzji MCA są tu pod ścisłą kontrolą eksperymentatora. Stąd też model ten daje powtarzalne wyniki i umożliwia przeprowadzenie serii badań ze zmianą czasu zarówno okluzji jak i reperfuzji mózgu i momentu podania potencjalnej substancji o działaniu ochronnym [Tatlisumak i wsp., 2007]. Ponadto, wielu badaczy korzysta z tego modelu i stosuje 90-minutową okluzję MCA z 72-godzinną reperfuzją, co umożliwia porównywanie wyników otrzymanych przez różne grupy badawcze i gromadzenie swoistego banku wiedzy o możliwych mechanizmach neuroprotekcji.

Mechnizmy odpowiedzialne za uszkodzenie mózgu w wyniku niedokrwienia i reperfuzji są złożone i nadal nie do końca wyjaśnione, natomiast dość dobrze zdefiniowane są czynniki ryzyka udaru, które pogarszają jego przebieg kliniczny i ostateczne skutki zdrowotne. Najważniejsze z tych czynników to choroby takie jak: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca i hiperlipidemia/otyłość, odgrywające istotną rolę w rozpadzie jednostek nerwowo-naczyniowych w trakcie udaru mózgu [Boehme i wsp., 2017, Przykaza., 2021]. Mimo to, przy projektowaniu badań doświadczalnych nieczęsto uwzględnia się fakt, że udar mózgu jest powikłany innymi schorzeniami. Metaanaliza przeprowadzona przez O'Collins i wsp. w 2013 roku, ujawniła że wśród 502 terapii testowanych na zwierzętach pod kątem leczenia udaru

mózgu u ludzi, tylko 10% z nich była testowana na zwierzętach z współistniejącym nadciśnieniem tętniczym. To z pewnością jedna z przyczyn niepowodzenia translacyjnego wyników badań doświadczalnych w udarze mózgu.

Mając na uwadze przytoczone wyżej fakty, w celu zwiększenia podobieństwa modelu do sytuacji klinicznej zaprojektowano użycie w tych badaniach także szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym. Należy podkreślić, że zmiany hemodynamiczne i zmiany w krążeniu mózgowym obserwowane u szczurów SHR są podobne do zmian w układzie krążenia osób z samoistnym nadciśnieniem tętniczym [Frohlich, 1972; Iadecola i wsp., 2008]. Ponadto, podobnie jak pacjenci doznający udaru mózgu, którzy oprócz nadciśnienia tętniczego mają różnego rodzaju zaburzenia metaboliczne, szczury SHR mogą wykazywać oporność na insulinę i zaburzenia metabolizmu lipidów [Iritani i wsp., 1977; Świsłocki i wsp., 1993]. Wymienione cechy szczurów SHR stanowią przyczynę, dla której ten model nadciśnienia tętniczego jest uważany za najlepszy odpowiednik nadciśnienia pierwotnego u ludzi (95% wszystkich chorych z nadciśnieniem tętniczym).

## **5.2. Wpływ NPY(13-36) na wielkość poniedokrwiennego uszkodzenia mózgu**

W przeprowadzonych badaniach wykazałem, że uszkodzenie mózgu pod wpływem 90-minutowego zamknięcia prawej tętnicy środkowej mózgu szczura i 72-godzinnej reperfuzji jest większe u szczurów ze współistniejącym nadciśnieniem tętniczym niż u szczurów bez nadciśnienia. U obu szczepów szczurów selektywny agonista Y2R wykazał działanie protekcyjne, nie tylko wtedy kiedy był podany w czasie trwania niedokrwienia, ale także po podaniu w czasie wczesnej reperfuzji. Ponadto, u szczurów obu szczepów posiadał podobną skuteczność.

Wyniki uzyskane na szczurach SD są zgodne z opublikowanymi poprzednio, uzyskanymi w doświadczeniach na szczurach szczepu Wistar [Śmiałowska i wsp., 2009]. Wykazano w nich, że NPY(13-36) podany do prawej komory mózgu 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia (120 minut) w takiej samej dawce jak w niniejszych badaniach, zmniejszył objętość poischemicznego uszkodzenia mózgu o 58% w stosunku do obserwowanego w grupie kontrolnej.

Dane przedstawione w niniejszej rozprawie poszerzają jednak wiedzę na temat neuroprotekcyjnych właściwości agonisty receptorów Y2. Wskazują nie tylko, że NPY(13-36) podany 30 minut po rozpoczęciu niedokrwienia istotnie zmniejszył objętość martwicy poniedokrwiennego mózgu u szczurów SD o 31,4%, ale także że jest skuteczny po podaniu



w czasie reperfuzji mózgu. Po podaniu NPY(13-36) 30 minut po odblokowaniu światła MCA zaobserwowałem zmniejszenie objętości martwicy u tych szczurów o 18,6% (vs grupa kontrolna). Oznacza to, że dla agonisty Y2R istnieje okno czasowe i, co bardzo ważne, chroni on tkanki mózgu przed uszkodzeniem reperfuzyjnym [Aronowski i wsp., 1997].

Ważnym i nowym wynikiem jest także stwierdzenie ochronnej roli NPY(13-36) u szczurów szczepu SHR. Objętość martwicy poniedokrwiennej u tych szczurów zmniejszyła się o 33,3% w stosunku do grupy kontrolnej po podaniu NPY(13-36) w czasie niedokrwienia i o 22,9% po podaniu NPY(13-36) w czasie wczesnej reperfuzji mózgu.

W analizie wyników niniejszych badań wykazałem, że objętość uszkodzenia mózgu w grupach kontrolnych szczurów SD i SHR jest istotnie niejednakowa, bowiem bezwzględna różnica między nimi wynosi 6,1 % i jest istotna statystycznie. Jest to wynik zgodny z dotychczasowymi danymi z piśmiennictwa, wykazującymi że zwierzęta z nadciśnieniem tętniczym mają istotnie większe poniedokrwienne uszkodzenia mózgu niż zwierzęta normotensyjne [Duverger i wsp., 1988; Chen i wsp., 2009; Garcia i wsp., 2013].

Jedną z przyczyn, większego uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu przy współobecnym nadciśnieniu tętniczym, jest względnie mniejsza objętość strefy półcienia, odżywianej przez krew napływającą w trakcie niedokrwienia z rekrutowanego krążenia obocznego. W mózgu, w ramach jego unaczynienia istnieje kilka systemów zabezpieczeń właściwego ukrwienia tkanek, najważniejsze w tym przypadku wydają się zespolenia tętniczo-tętnicze (LMA, ang. *Leptomeningeal anastomoses*) w obrębie naczyń powierzchniowych opony miękkiej mózgu. Podczas zamknięcia MCA, połączenia pomiędzy terytoriami tętnicy mózgowej przedniej oraz tylnej (ang. *Anterior cerebral artery*, ACA; *Posterior cerebral artery*, PCA) i MCA mogą utrzymać przepływ do strefy półcienia, którą zgodnie z teorią można dzięki temu uratować, jeśli reperfuzja nastąpi odpowiednio szybko lub zadziała leczenie neuroprotektoryjne [Hossmann, 2006; Cipolla i wsp., 2018a]. Uruchomienie tego systemu zabezpieczenia ukrwienia obszaru okołozawałowego leżało zapewne u podstaw mniejszego uszkodzenia mózgu u szczurów SD. Nadciśnienie tętnicze zmniejsza możliwości otwarcia tych anastomoz ze względu na adaptacyjne zmiany strukturalne powstające w naczyniach krążenia mózgowego pod wpływem nadciśnienia tętniczego. Do tych zmian należą pogrubienie ścian naczyń związane z przerostem warstwy środkowej (ang. *Hypertrophic remodeling*) prowadzące do zmniejszenia światła naczyń i zwiększenia oporu przepływu oraz sztywnienie ściany naczyniowej [Santisteban i wsp., 2018]. W tym kontekście ważna jest informacja pochodząca z obserwacji klinicznych, że u pacjentów z udarem z towarzyszącym chronicznym nadciśnieniem tętniczym przepływ przez anastomozy LMA jest

znacznie zubożony [Fujita i wsp., 2019].

Moje badania wykazały, że po podaniu NPY(13-36) u szczurów szczepu SD wraz z upływem czasu okluzji dochodzi do poprawy ukrwienia strefy penumbry. Mikroprzepływ w końcowej fazie niedokrwienia był o 14% wyższy niż tuż po okluzji MCA. To jest niewątpliwie poprawa dopływu krwi do penumbry, najprawdopodobniej na skutek otwarcia wyżej wymienionych anastomoz. Takiego efektu podania NPY(13-36) nie zaobserwowałem u szczurów SHR. Przepływ w penumbrze utrzymywał się u nich na tym samym poziomie przez cały czas niedokrwienia. Co interesujące, u tych szczurów można było obserwować tendencję do wzrostu mikroprzepływu w penumbrze zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie z NPY(13-36), ale ze względu na duży rozrzut wartości brak było istotności statystycznej. Ta tendencja do poprawy ukrwienia penumbry w czasie niedokrwienia u szczurów SHR jest najprawdopodobniej związana z wysokim ciśnieniem tętniczym tych zwierząt i naturalną tendencją całego systemu do przeciwstawiania się okluzji/hipoperfuzji. Samorzutne reperfuzje w czasie trwania niedokrwienia są zjawiskiem często obserwowanym w tym modelu, także u szczurów normotensyjnych.

Zatem, zmniejszenie objętości uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu u szczurów SD po podaniu agonisty Y2R można częściowo wytłumaczyć korzystnym wpływem tego peptydu na ukrwienie penumbry.

U obu szczepów szczurów, SD i SHR, mechanizm odpowiedzialny za ochronę mózgu w niedokrwieniu po podaniu NPY(13-36) może być związany z, opisanym we wstępie rozprawy, hamowaniem ekscytotoksyczności i niekorzystnych zjawisk zachodzących w okresie reperfuzji (stres oksydacyjno-nitrozacyjny, depolaryzacje okołozawałowe, stan zapalny). O hamowaniu procesów destrukcyjnych przez NPY(13-36) w okresie reperfuzji w moich badaniach świadczy jego korzystne działanie po podaniu po odblokowaniu światła MCA. Hamowanie ekscytotoksyczności pod wpływem NPY(13-36) obserwowano w modelu niedokrwienia mózgu *in vitro* w badaniach na pierwotnych hodowlach mysich neuronów kory mózgowej, poddanych deprivacji tlenowo-glukozowej (OGD, ang. *Oxygen-glucose deprivation*) [Domin i wsp. 2017]. W tych badaniach, po podaniu NPY(13-36) obserwowano również zmniejszenie aktywności kalpain, enzymów proteolitycznych stanowiących jedno z ogniw w kaskadzie mechanizmów uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu, między innymi, w stosowanym przeze mnie modelu [Bartus i wsp., 1994; Markgraf i wsp., 1998; Peng i wsp., 2011]. Oprócz bezpośredniego wykazania hamowania ekscytotoksyczności (zmniejszenie uwalniania glutaminianu), w badaniach Domin i wsp. (2017) pokazano także, że agonista Y2R działa neuroprotekcynie po podaniu z opóźnieniem 30 minut w stosunku do momentu

zastosowania OGD.

Odroczone działanie neuroprotekcyjne NPY(13-36) obserwowano także *in vivo* i *in vitro* w modelu ekscytotoksyczności indukowanej przez kwas kainowy w hipokampie [Śmiałowska i wsp. 2009]. W badaniach *in vivo* obserwowano neuroprotekcję, gdy agonistę Y2R podano do hipokampa godzinę po podaniu kwasu kainowego. Efekt neuroprotekcyjny opóźnionego traktowania NPY(13-36) w tym modelu obserwowali wcześniej także Wu i Li (2005), którzy podawali tego agonistę Y2R 8 godzin po wstrzyknięciu kwasu kainowego do hipokampa u myszy. Z kolei w badaniach *in vitro* na hodowlach pierwotnych komórek nerwowych pochodzących z kory mózgowej i hipokampa myszy, NPY(13-36) skutecznie zapobiegał śmierci neuronów korowych po podaniu po 1 godzinie, natomiast neuronów hipokampa po podaniu po 3 godzinach od rozpoczęcia ekspozycji na kwas kainowy [Śmiałowska i wsp., 2009]. Neuroprotekcję po podaniu NPY(13-36) w modelu ekscytotoksyczności wywołanej ekspozycją na kwas kainowy obserwowano także na skrawkach organotypowych pochodzących z hipokampa szczura [Xapelli i wsp., 2007]. Według Domin i wsp. (2017), hamowanie nadmiernego wydzielania glutaminianu może być jednym z podstawowych mechanizmów działania neuroprotekcyjnego, osiągniętego poprzez pobudzenie receptorów Y2. W tym kontekście przypomnę, o czym pisałem we wstępie, że aktywacja presynaptycznie usytuowanych receptorów Y2 prowadzi do hamowania kanałów wapniowych aktywowanych napięciem, kanałów typu N i P/Q. Blokuje to wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, niezbędnego do presynaptycznego uwalniania glutaminianu i w następstwie zmniejsza prawdopodobieństwo wygenerowania potencjału czynnościowego [Sun i wsp., 2001].

Porównanie wpływu podania NPY(13-36) do hodowli komórkowych poddanych OGD [Domin i wsp., 2017] i podania tego agonisty Y2R szczurom z niedokrwieniem mózgu – za pomocą metaanalizy podgrup, wykazało znacząco duże wielkości efektów (całkowita wielkość efektu:  $RMSSE = 1,29$ ,  $Z = 6,11$ ,  $P < 0,00001$ ) oraz duże podobieństwo wielkości efektów działania NPY(13-36) przeciw niedokrwiennej śmierci komórek we wszystkich zastosowanych trybach podania tego agonisty (całkowita heterogeniczność:  $I^2 = 2\%$ ,  $P = 0,38$ ). Wynik ten ujawnia porównywalne wielkości efektów traktowania agonistą Y2R w modelu *in vitro*, składającym się tylko z neuronów (pierwotna hodowla neuronalna), jak i w modelach zawierających całą jednostkę nerwowo-naczyniową (szczury). Wykazano także brak różnicy pomiędzy szczurami normotensyjnymi i szczurami szczepu SHR (heterogeniczność w podgrupie *in vivo*:  $I^2 = 0\%$ ,  $P = 0,37$ ). Powyższe wyniki sugerują, że agonista Y2R chroni nie tylko same neurony, ale także inne komponenty NVU przeciwko

niedokrwieniu/reperfuzji i jest podobnie skuteczny w ochronie niedokrwionego mózgu szczurów, u których współwystępuje nadciśnienie tętnicze, jak i szczurów bez chorób współistniejących [Przykaza i Koźniewska., 2022]. Te sugestie zostały potwierdzone w badaniach czynnościowych, a także częściowo w obserwacjach zmian w regulacji i gęstości naczyń mikrokrążenia omówionych poniżej.

### **5.3. Wpływ NPY(13-36) na niedokrwienne zaburzenia chodu i spontanicznej aktywności ruchowej**

Jednym z objawów charakterystycznych dla pacjentów dotkniętych ogniskowym udarem niedokrwinnym mózgu jest osłabienie siły mięśni oraz niedowład jednej połowy ciała – zaburzenia posturalne, zaburzenia równowagi i chodu. Około 70 - 85% wszystkich pacjentów przejawia niedowład połowiczy bezpośrednio po udarze [Dobkin, 1991]. Zaburzenia posturalne, zaburzenia chodu i zmniejszenie spontanicznej ruchliwości obserwowane jest także u zwierząt po udarze niedokrwinnym [Encarnacion i wsp., 2011; Parkkinen i wsp., 2013]. Dlatego też, w niniejszych badaniach zaplanowane zostało doświadczenie nad wpływem NPY(13-36) na sprawność chodu i na spontaniczną aktywność ruchową, mające potwierdzić, że morfologicznie obserwowana neuroprotekcja ma implikacje czynnościowe.

Badania czynnościowe zostały przeprowadzone 72 godziny po reperfuzji mózgu. Czas ten jest optymalny na przeprowadzenie takich badań, ponieważ jest wystarczający do rozwinięcia się pełnego uszkodzenia, obrzęku i reakcji zapalnej w mózgu, a także z drugiej strony jest zbyt krótki by rozwinęły się znaczące adaptacje do pierwotnego upośledzenia motorycznego.

Ocenę prawidłowości chodu przeprowadzono z użyciem testu CatWalk, służącego do automatycznej i kompleksowej cyfrowej analizy parametrów chodu u gryzoni. Wykazałem, że 72 godziny po reperfuzji w grupach kontrolnych szczurów normotensyjnych SD, jak i SHR istotnym zmianom w stosunku do stanu sprzed niedokrwienia uległy parametry chodu. Zmniejszeniu uległa średnia prędkość chodu zwierzęcia (ang. *Mean gait speed*) oraz długość kroku (ang. *Stride length*). Poza tym, wydłużył się czas cyklu kroku (ang. *Step cycle duration*), na który składają się czas podporu (ang. *Stand phase duration*) oraz czas fazy przenoszenia (ang. *Swing phase duration*). Dla wszystkich kończyn zmiany parametrów czasowych i długości kroku były istotne statystycznie i wielkością zbliżone u obu badanych

szczepów szczurów. Są to wyniki pozostające w zgodzie z danymi dostępnymi w piśmiennictwie [Encarnacion i wsp., 2011; Parkkinen i wsp., 2013]. Wykazałem także, że NPY(13-36) poprawia chód szczurów obu szczepów. Zaobserwowałem istotne zmniejszenie zmian procentowych (dzień przed niedokrwieniem vs 72 godziny po reperfuzji) niektórych z zaburzonych parametrów chodu szczurów SD i SHR w stosunku do grup kontrolnych, zarówno w grupach z NPY(13-36) podanym podczas ischemii mózgu jak i, w mniejszym stopniu – po podaniu peptydu po rekanalizacji MCA. Parametrami, które uległy największej poprawie były: czas cyklu kroku oraz długość kroku, będące istotnymi korelatami prędkości chodu.

Poprawa sprawności chodu po podaniu NPY(13-36) może wynikać bezpośrednio ze zmniejszenia obszaru uszkodzenia mózgu pod wpływem tego peptydu. Przeprowadzona przeze mnie analiza korelacji pomiędzy wielkością uszkodzenia mózgu a zmianami wybranych parametrów chodu, łącznie u obu szczepów szczurów, wskazuje, że taka korelacja istnieje jedynie w stosunku do niektórych parametrów chodu. Wyniki analizy wskazują na statystycznie istotną ( $p < 0,05$ ) i silną (współczynnik korelacji Pearson'a  $\sim 0,9$ ) dodatnią korelację pomiędzy wielkością uszkodzenia mózgu i: zmianą czasu cyklu kroku; czasu podparcia łapy; czasu przeniesienia łapy. Oznacza to, że wraz ze zmniejszeniem wielkości uszkodzenia, skraca się czas każdego z tych parametrów charakteryzujących chód. Natomiast nie stwierdziłem istnienia korelacji pomiędzy wielkością uszkodzenia mózgu, a zmianą prędkości chodu oraz długości kroku i prędkości przeniesienia łapy. Dwa z tych parametrów – prędkość chodu oraz długość kroku są kluczowymi parametrami oceny chodu, których poprawa po podaniu NPY(13-36) jest największa. Uważam więc, że na podstawie otrzymanych wyników analizy korelacji oraz samych wyników testu CatWalk, można wysunąć hipotezę, że NPY(13-36) poprawił poudarowe upośledzenie chodu nie tylko poprzez zmniejszenie wielkości martwicy w mózgu. Dla dopełnienia analizy, zbadałem również korelację pomiędzy zmianą długości kroku i zmianą średniej prędkości chodu oraz zmianą czasu cyklu kroku, obie korelacje okazały się statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ), i silne (współczynnik korelacji Pearson'a  $\sim 0,9$ ) – wraz z wydłużeniem długości kroku, wydłuża się średnia prędkość chodu oraz skraca czas cyklu kroku.

Wyniki badania dwóch ostatnich korelacji wskazują, że wzrost prędkości chodu oraz skracanie czasu cyklu kroku u leczonych szczurów z udarem mózgu są związane z wydłużaniem się kroku, co jest zgodne z zależnościami opisanymi przez Herbin'a i wsp. (2004, 2006). W tych badaniach chodu zdrowych gryzoni (myszy) stwierdzono podobne zależności prędkości i parametrów dynamiki kończyn. Wykryto, że w chodzie typu

symetrycznego, wzrost prędkości na ogół wynika w równym stopniu ze wzrostu częstotliwości kroków (*cadence*), jak i długości kroku. Z drugiej strony w chodzie niesymetrycznym wzrost prędkości chodu osiągnany jest różnie – w zależności od wielkości tejże prędkości. Wraz ze wzrostem prędkości, rośnie ona najpierw w wyniku zwiększonej częstotliwości kroków, a następnie, jak w chodach symetrycznych, wzrostem w równym stopniu obu zmiennych i wreszcie przy bardzo dużej prędkości, wzrasta ona wraz ze wzrostem długości kroku. W obu, chodzie symetrycznym i niesymetrycznym, skrócenie czasu cyklu kroku – faz podporu kończyną i przeniesienia kończyny – przyczynia się do wzrostu częstotliwości kroków.

Reasumując, chód badanych przeze mnie zwierząt przyspiesza się wedle charakterystyki zgodnej z danymi piśmiennictwa, aczkolwiek sam wpływ agonisty Y2R na poprawę chodu, prawdopodobnie nie może być wyjaśniony jedynie zmniejszeniem wielkości poudarowego uszkodzenia mózgu. Prędkość chodzenia może być również interpretowana jako częściowy wyznacznik ogólnej kondycji szczura, na który może mieć wpływ wiele czynników. Niektórzy autorzy zwracali uwagę, że zależność wielkości poniedokrwiennego uszkodzenia mózgu i wyników badania funkcjonalnego nie jest jasna [Turner i wsp., 2016]. Jednym z dodatkowych wpływów terapeutycznych pobudzenia Y2R mogło by być zmniejszenie uogólnionego stanu zapalnego lub obrzęku mózgu [Lee i wsp., 2022; praca przeglądowa Przykaza i Koźniewska, 2022]. Badając potencjalne związki o działaniu ochronnym w niedokrwieniu mózgu należy uwzględniać wymienione wyżej aspekty metodologiczne i interpretacyjne.

W teście otwartego pola, który przeprowadziłem u obu szczepów szczurów zarówno przed ogniskowym niedokrwieniem/reperfuzją mózgu jak i 72 godziny po reperfuzji mózgu obserwowano istotny wpływ niedokrwienia na oceniane parametry aktywności ruchowej. Istotnemu zmniejszeniu uległy: prędkość chodu (ang. *Velocity*); czas spędzony na przemieszczaniu się (ang. *Moving time*); a także całkowita przebyta droga (ang. *Total distance*). Badane zwierzęta przejawiały małowruchliwość, umieszczone na początku badania w centrum areny otwartego pola pozostawały w nim większość czasu testowego lub przemieszczały się pod ścianę otaczającą arenę i tam pozostawały przez większość czasu.

W obu grupach szczurów SD i SHR, którym podano NPY(13-36) nie zaobserwowano poprawy ruchliwości spontanicznej w teście otwartego pola.

Test otwartego pola jest technicznie stosunkowo prostą metodą oceny spontanicznej aktywności ruchowej gryzoni, ale na wzorce eksploracji wpływa także stan emocjonalny badanych zwierząt, stąd wyniki testu i ich interpretacja mogą być bardzo skomplikowane.

Jednakże przede wszystkim aktywność zwierząt w otwartym polu nie jest wywoływana dodatkowymi bodźcami prócz pustej przestrzeni otoczonej ściankami, stąd można założyć, że jest woluntaryczna, czyli w pełni zależna od sumarycznej kondycji zwierzęcia, w przeciwieństwie do testu chodu CatWalk, w którym początek ruchu jest niejako wymuszony na zwierzęciu poprzez stymulację dźwiękiem dzwonka.

Małoruchliwość w otwartym polu po niedokrwieniu mózgu opisywano też w badaniach na myszach [Li i wsp., 2005; Winter i wsp., 2005]. Dokładny czas małoruchliwości po niedokrwieniu opisywany w piśmiennictwie jest zróżnicowany i prawdopodobnie zależny od wielu czynników, w tym np. modelu niedokrwienia mózgu, ciężkości procedury chirurgicznej i gatunku oraz szczepu zwierzęcia. Należy nadmienić, że niektórzy autorzy obserwowali także zjawisko nadmiernej aktywności ruchowej – po raz pierwszy opisane u szczurów, ale wykazane również u myszy, rozpoczynające się kilka dni po niedokrwieniu mózgu, i mogące trwać nawet do kilku miesięcy [Winter i wsp., 2005; Kilic i wsp., 2008].

Z jednej strony jednoczesne wystąpienie efektu poprawy funkcji chodu oraz brak poprawy aktywności ruchowej/eksploracyjnej można tłumaczyć zróżnicowaniem istoty przeprowadzonych testów. W teście CatWalk, jak wspomiałem wyżej, zwierzęta były stymulowane do rozpoczęcia biegu po bieżni, natomiast w teście otwartego pola nie otrzymywały żadnego bodźca zewnętrznego. Drugą prawdopodobną przyczyną mógł być brak efektu ochronnego agonisty Y2R na poniedokrwienne uszkodzenie prążkowiego grzbietowego. Uzyskane w niniejszych eksperymentach obrazy morfologiczne (TTC) wskazują na duże uszkodzenie prążkowiego w grupie kontrolnej, oraz na mały (ale widoczny) efekt protekcyjny agonisty Y2R uwidaczniający się w dolnej partii prążkowiego – prążkowiego brzuszyn. Część grzbietowa prążkowiego bierze udział w regulacji spontanicznej aktywności i podejmowania decyzji, jego uszkodzenie może spowodować objawy depresyjne, w tym małoruchliwość. W części brzuszyn prążkowiego znajdują się między innymi skupiska istoty szarej regulujące funkcje chodu. Wykazano zróżnicowaną dystrybucję receptorów Y2 w prążkowie, charakteryzującą się ich brakiem w prążkowie grzbietowym i wykrywalną obecnością w prążkowie brzuszyn (*Nucleus accumbens*) [Stanić i wsp., 2006].

Inną przyczyną mógł być sposób podania NPY(13-36), aplikowano go bowiem poprzez iniekcję dokomorową, co również jest dodatkowym czynnikiem, mogącym pogłębić uszkodzenie mózgu, lub też wywołać niewielkie wewnątrzmożgowe wylewy krwi, co mogłoby być przyczyną zmniejszenia aktywności spontanicznej zwierząt.

W przyszłości należałoby zastosować cząsteczki, których kowalencyjne przyłączenie do peptydu NPY(13-36), spowodowałoby uzyskanie przez agonistę możliwości penetracji bariery krew-mózg, stąd umożliwiłoby podanie agonisty poprzez iniekcje dootrzewnowe lub dożylnie [Bechara i wsp., 2013; Guidotti i wsp., 2017].

W kontekście wyników niniejszych badań i podkreślonych na początku dyskusji podobieństw zastosowanego modelu do udaru niedokrwiennego u ludzi warto jest wspomnieć o zaburzeniach chodu obserwowanych u pacjentów z tym typem udaru.

U pacjentów po udarze, związanym z zatorem tętnicy środkowej mózgu, stwierdza się głębokie zaburzenia chodu związane z uszkodzeniem w obszarach odpowiedzialnych za kontrolę lokomocji oraz z osłabieniem mięśniowym po stronie ciała przeciwnej (kontralateralnej) do uszkodzonej półkuli mózgu. Zmniejszona prędkość chodu jest charakterystyczną oznaką zaburzeń chodu po udarze. Wraz ze spadkiem prędkości chodu, zarówno długość kroku, jak i frekwencja kroków (liczba kroków na jednostkę czasu; ang. *Cadence*) są mniejsze niż wartości u osób pełnosprawnych. Na prędkość chodu ludzi jak i szczurów bezpośredni wpływ mają czas cyku kroku (czyli sumaryczny czas poszczególnych jego faz – fazy podporu kończyną i fazy przenoszenia kończyny) oraz długość kroku [von Schroeder i wsp., 1995; Balaban i wsp., 2014]. Prędkość jest wskaźnikiem całościowej wydajności chodu i jest bardzo ważnym parametrem w ocenie sprawności pacjentów po udarze jak i w ocenie ewentualnych postępów w ich rehabilitacji poudarowej czy też skuteczności leczenia samego niedokrwienia mózgu.

#### ***5.4. Wpływ NPY(13-36) na zaburzenia regulacji mikrokrążenia krwi w korze mózgowej w strefie półcienia ischemicznego***

W doświadczeniach tej serii badań stwierdzono, że odpowiedź mikrokrążenia kory mózgowej w półkuli ipsilateralnej w obszarze półcienia ischemicznego na indukowaną hiperkapnię nie zmieniła się istotnie u szczurów szczepu SD 24 godziny po reperfuzji, uległa natomiast istotnemu pogorszeniu u szczurów SHR. Po podaniu NPY(13-36), odpowiedź na hiperkapnię u tych szczurów nie uległa poprawie, niezależnie od wariantu podania peptydu.

W warunkach fizjologicznych, wzrost  $p\text{CO}_2$  wpływa hamująco na mięśniówkę gładką ściany naczyniowej, co prowadzi do rozszerzenia naczyń i zmniejszenia tym samym oporu naczyniowego. Reakcja ta jest proporcjonalna do zmiany  $p\text{CO}_2$  w zakresie od 20 mmHg do 80 mmHg. Rozszerzenie naczyń mikrokrążenia mózgowego w hiperkapnii zależy bezpośrednio od obniżenia pH w przestrzeni okołonaczyniowej [Kontos i wsp., 1977].



Odpowiedź jest niezależna od funkcji śródbłonna, a ewentualny udział w niej tlenu azotu zależy od NO pochodzenia nerwowego, uwalnianego z zakończeń nitrergiczych [Lindauer i wsp., 2001].

Wyniki otrzymane w moich badaniach u szczurów SD są zgodne z publikacjami innych autorów, którzy prowadzili obserwacje w tym samym modelu 90-minutowego zamknięcia MCA [Ono i wsp., 1997; Olah i wsp., 2000]. W ich przypadku, krótszy był czas reperfuzji, po którym prowadzono badania reaktywności na hiperkapnię. Cytowani autorzy obserwowali znaczne upośledzenie reaktywności na CO<sub>2</sub> podczas niedokrwienia (pomiar był możliwy dzięki zastosowaniu techniki jądrowego rezonansu magnetycznego) zarówno w ognisku niedokrwienia jak i w penumbrze. W ciągu kilku godzin reperfuzji reaktywność na CO<sub>2</sub> powoli powracała, ale jedynie w korze mózgowej penumbry. Wyniki opisane w mojej pracy dotyczą 24 godzin po reperfuzji, więc tym bardziej reaktywność na CO<sub>2</sub> w obszarze penumbry powinna być zachowana.

Zmniejszenie reaktywności na CO<sub>2</sub> w mikrokrążeniu w korze mózgowej w strefie penumbry u szczurów SHR po niedokrwieniu jest najprawdopodobniej związane z nałożeniem się stresu oksydacyjnego spowodowanego niedokrwieniem i reperfuzją na zmiany wywołane samym nadciśnieniem. W nadciśnieniu tętniczym u szczurów SHR opisywane są zmiany strukturalne w mięśniach gładkich ściany naczyniowej oraz zmiany regulacji napięcia ściany związane ze stresem oksydacyjnym [Baumbach i wsp., 1988; Iadecola i wsp., 2008]. Zmiany strukturalne mają charakter adaptacyjny, polegają na przeroście i rozplemie komórek mięśni gładkich, prowadzącym do pogrubienia ściany naczyniowej oraz zwężenia światła. Zmiany te powodują przesunięcie krzywej autoregulacji przepływu w stronę większych wartości ciśnienia, co umożliwia ochronę mikrokrążenia przed propagacją wysokiego ciśnienia do tej części łoża naczyniowego. Nie wydaje się natomiast, żeby upośledzeniu ulegała zdolność mięśni gładkich do rozkurczu [Iadecola i wsp., 2019].

Stres oksydacyjny wywołany nadciśnieniem polega między innymi na produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS, ang. *Reactive oxygen species*) przez układy naczyniowe: NOX (zwłaszcza izoformę NOX2; ang. *NADPH oxidase*) i XO (ang. *Xanthine oxidase*) [Iadecola i wsp., 2008]. Wykazano, że aktywność NOX2 i XO jest zwiększona w naczyniach zwierząt czy też pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [Datla i wsp., 2010]. Zwiększenie aktywności NOX2 prowadzi do wzrostu wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego O<sup>2-</sup>, który reaguje z NO tworząc wysoce reaktywny rodnik – nadtlenoazotyn. Stan ten nazywa się czynnościowym rozprężeniem (ang. *Functional uncoupling*) eNOS. W ten sposób zmniejsza się biodostępność NO i powstaje brak równowagi między tym ważnym czynnikiem

rozszerzającym naczynia krwionośne a czynnikami zwężającymi naczynia, co zaburza regulację napięcia ściany naczyń [Pacher i wsp., 2007; Touyz i wsp. 2020]. Drugim aspektem rozprężenia eNOS, jest generowanie przez nią dużych ilości  $O^{2-}$ , do czego powrócę a dalszej części dyskusji.

W patofizjologii nadciśnienia tętniczego ważną rolę odgrywają również zapalenie ogólnoustrojowe i neurozapalenie. Trwające procesy produkcji ROS i neurozapalenie prawdopodobnie uszkadzają różne komórki, które w związku z tym uwalniają cząsteczki będące sygnałami DAMPs [McCarthy i wsp., 2014]. Cząsteczki te są dobrze znanymi aktywatorami receptorów TLR4. Receptory TLR4 były pierwszymi receptorami z grupy TLR, zaproponowanymi do wyjaśnienia etiologii naczyniowych uszkodzeń zapalnych w nadciśnieniu tętniczym [Bomfim i wsp., 2012]. Pobudzenie śródbłonkowych TLR4, prowadzi poprzez białko MyD88 do aktywacji czynników transkrypcyjnych AP-1 i NF- $\kappa$ B, które dodatkowo wzmagają toczące się zapalenie [Yang i wsp., 2016].

Odpowiedź mikrokrążenia kory mózgowej w obszarze półcia ischemicznego na zablokowanie syntezy tlenu azotu zmniejszyła się istotnie u obu szczurów szczepów SD i SHR 24 godziny po niedokrwieniu. W grupie z NPY(13-36) podanym 30 minut po reperfuzji nie stwierdzono poprawy odpowiedzi na L-NAME w stosunku do grupy kontrolnej, ani u szczurów SD, ani u SHR. Natomiast podanie NPY(13-36) w czasie reperfuzji przywróciło tę odpowiedź u szczurów szczepu SHR.

L-NAME jest nioselektywnym blokerem konstytutywnych izoform syntazy NO tzn. izoformy endotelialnej (eNOS) oraz neuronalnej (nNOS). Obie syntazy są istotne z punktu widzenia regulacji mikroprzepływu na poziomie NVU, ponieważ oba źródła tlenu azotu uczestniczą w przekrwieniu czynnościowym. NO wydzielany z zakończeń nitregergicznych w naczyniach mikrokrążenia prowadzi do bezpośredniego rozszerzenia naczyń i zwiększenia mikroprzepływu [Tang i wsp., 2000]. NO pochodzenia neuronalnego jest też mediatorem postsynaptycznym w synapsach glutaminergicznych i uczestniczy w modulacji sygnałów odpowiedzialnych za przekrwienie czynnościowe [Iadecola 2017]. Endotelialna syntaza NO, pobudzana pod wpływem sił tarcia przepływającej krwi o ścianę naczynia krwionośnego uczestniczy we wstępującym rozszerzeniu naczyń krwionośnych w procesie sprzężenia nerwowo-naczyniowego [Kozłowska i wsp., 1992; Anderson, 2006]. Zmniejszenie odpowiedzi na L-NAME może wskazywać zatem na zaburzenia funkcji jednostki nerwowo-naczyniowej i mechanizmów przekrwienia czynnościowego w strefie penumbry. Strefa ta leży w obszarze somatosensorycznej kory mózgu, biorącej udział w generowaniu wzorców ruchu potrzebnych do prawidłowej lokomocji [Chapin i wsp., 1981; Armstrong i wsp., 1984;

Dombeck i wsp., 2007; Dombeck i wsp., 2009]. Upośledzenie mechanizmów przekrwienia czynnościowego może stanowić istotną przyczynę zaburzeń chodu obserwowanych w moich badaniach w teście CatWalk.

Przywrócenie odpowiedzi mikrokrążenia na L-NAME po podaniu NPY(13-36) wskazuje na ochronne działanie tego peptydu w okresie reperfuzji, ale tylko u szczurów z nadciśnieniem tętniczym. Zwiększenie wskaźnika oporu w mikrokrążeniu po podaniu L-NAME u tych szczurów świadczy o tym, że jest NO jest w tych warunkach tonicznie aktywny w naczyniach mikrokrążenia w strefie penumbry.

Pojawienie się odpowiedzi mikrokrążenia na L-NAME u szczurów SHR (oraz jej brak u szczurów SD) po zastosowaniu NPY(13-36), można by wytłumaczyć większym efektem hamowania stresu oksydacyjnego w okresie reperfuzji u szczurów SHR niż u szczurów SD przez ten peptyd. Hamowanie stresu oksydacyjnego oznacza zmniejszenie wytwarzania  $O_2^-$ , co zwiększa dostępność NO.

#### **5.5. Wpływ NPY(13-36) na zmniejszenie gęstości naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej 72 godziny po reperfuzji mózgu**

Gęstość naczyń mikrokrążenia w strefie półcienia ipsilateralnej kory mózgowej 72 godziny po niedokrwieniu mózgu zmniejszyła się istotnie u obu badanych szczepów szczurów, u szczurów SD było to zmniejszenie o ok. 12%, a u SHR o ok. 7%.

Jednocześnie u szczurów szczepu SHR odnotowano już wyjściowo mniejszą o ok. 6% gęstość naczyń mikrokrążenia w stosunku do szczurów normotensyjnych. Ta obserwacja jest zgodna z danymi piśmiennictwa opisującymi rozrzedzenie (ang. *Rarefaction*) naczyń w mikrokrążeniu w korze mózgowej i w innych narządach nie tylko u szczurów SHR, ale także u ludzi z nadciśnieniem tętniczym [Chen i wsp., 1981; Sokolova i wsp., 1985; Paiardi i wsp. 2009; Murfee i wsp., 2008]. Zmniejszona gęstość unaczynienia mózgu u tego szczepu może mieć także związek przyczynowy ze zmniejszeniem objętości kory mózgowej, bowiem jak powszechnie wiadomo właściwa perfuzja krwią jest niezbędna do utrzymania przy życiu komórek nerwowych i innych typów komórek obecnych w mózgu [Koundal i wsp., 2018].

Zmniejszenie gęstości naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej po niedokrwieniu mózgu jest opisywane w piśmiennictwie. Niedawno Wadowski i wsp., (2022) opublikowali dane o istotnym, ok. 18%, zmniejszeniu gęstości naczyń mikrokrążenia mózgu 24 godziny po udarze niedokrwinnym.

Podanie NPY(13-36) zarówno w czasie niedokrwienia, jak i reperfuzji normalizowało gęstość najmniejszych naczyń w korze mózgu w obszarze penumbry u obu szczepów szczurów. Na podstawie uzyskanych wyników trudno jest stwierdzić podłoże tego efektu, czy jest to działanie ochronne, czy też odbudowa zniszczonej sieci naczyniowej np. na drodze angiogenezy.

Angiogeneza to złożony proces, regulowany przez wiele czynników. Najważniejszymi z nich są czynniki wzrostu takie jak: podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF) i śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). W dorosłym organizmie procesy angiogenezy są stymulowane głównie w sytuacjach patologicznych. Uszkodzenie bariery krew-mózg po niedokrwieniu powoduje regenerację mikrokrążenia w dojrzałym mózgu szczura [Hayashi i wsp., 2003; Sun i wsp., 2003] oraz u pacjentów po udarze, co zostało udokumentowane badaniami histologicznymi i immunohistochemicznymi tkanek pośmiertnych mózgu [Krupiński i wsp., 1993]. Eksperymentalne badania na modelach zwierzęcych pokazują, że angiogeneza może być wywołana już pierwszego dnia po epizodzie niedokrwieniowym [Hayashi i wsp., 2003; Sun i wsp., 2003] i postuluje się, że jest jednym z endogennych procesów regeneracyjnych po udarze doświadczalnym i u pacjentów [Ergul i wsp., 2012; Kanazawa i wsp., 2019].

Wiadomo, że agoniści Y2R odgrywają istotną rolę w indukcji i progresji angiogenezy [Lee i wsp., 2003; Saraf i wsp., 2016; Kanazawa i wsp., 2019]. Wykazano, że potencjał i skuteczność ligandów Y2R w stymulowaniu angiogenezy są podobne do wykazywanych przez FGF i VEGF [Zokowska-Grojec i wsp., 1998; Ghersi i wsp., 2001; Lee i wsp., 2003]. Sugerowano, że ligandy Y2R mogą zaczynać działanie przed VEGF i FGF i mogą być kluczowym czynnikiem inicjującym angiogenezę [Conn i wsp., 1990]. Wykazano, że stymulacja Y2R indukuje angiogenezę poprzez proliferację, przeżycie i migrację komórek śródbłonka [Kitlińska i wsp., 2002; Movafagh i wsp., 2006]. W piśmiennictwie brak danych na temat stymulacji poniedokrwiennej angiogenezy przez agonistów Y2R w mózgu, ale pozytywny wpływ stymulacji Y2R na procesy angiogenezy po niedokrwieniu w mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych jest dobrze udokumentowany [Saraf i wsp., 2016]. Ponadto Robich i wsp., 2010 wykazali znaczny spadek stężenia czynników anty-angiogennych – endo- i angiostatyny w niedokrwionym mięśniu sercowym zwierząt leczonych selektywnym agonistą Y2R. Zatem, z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że aktywacja Y2R może powodować stymulację angiogenezy w strefie półcienia, w mózgu po niedokrwieniu. W kontekście angiogenezy można także zaznaczyć, że sprzyja

ona procesom neurogenezy [Teng i wsp., 2008]. Choć nie ma danych na temat bezpośredniego wpływu pobudzenia Y2R na stymulację poniedokrwiennej neurogenezy w mózgu, udokumentowano że selektywny agonista Y2R wzmacnia ekspresję neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), jeden z najważniejszych stymulatorów neurogenezy w mózgu dorosłego człowieka w mysim modelu choroby Huntingtona [Fatoba i wsp., 2018].

### **5.6. Wpływ NPY(13-36) szczelność naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej 72 godziny po reperfuzji mózgu**

W tej serii badań zauważono po pierwsze, że naczynia mikrokrążenia w korze mózgowej szczurów SHAM SHR charakteryzują się dużą przepuszczalnością dla IgG.

Analiza statystyczna ujawniła, że szczury z nadciśnieniem tętniczym mają ok. 3 razy więcej naczyń przeciekających niż szczury normotensyjne. Podanie NPY(13-36) nie wpłynęło na licznosc miejsc przeciekania w mikronaczyjniach u obu szczepów szczurów, jednakże u szczurów SHR widoczna jest tendencja do obniżania licznosci przecieków naczyniowych, gdy agonistę Y2R podawano w obu wariantach czasowych. Badania te prowadzone były 72 godziny po niedokrwieniu w regionie półcienia. Brak istotności wpływu podania agonisty Y2R można częściowo tłumaczyć specyfiką formy tego podania, bowiem jest to podanie poprzez iniekcję dokomorową, która powoduje także przerwanie struktur naczyniowych w miejscu wprowadzania igły iniekcyjnej.

Przyczyną braku zmniejszenia przeciekania naczyń mikrokrążenia po podaniu NPY(13-36) może być dyskutowane wyżej pobudzenie angiogenezy. Nowo powstałe naczynia mikrokrążenia są niedojrzałe, co manifestuje się brakiem bariery krew-mózg i znaczną przepuszczalnością. Dojrzewanie bariery krew-mózg w takich nowych naczyniach następuje po okresie nie krótszym niż kilka tygodni [Arai i wsp., 2009; Beck i wsp., 2009; Yang i wsp., 2013].

Dotychczasowe badania podstawowe w dziedzinie ochrony tkanek mózgu poddanych warunkom niedokrwienia i reperfuzji, mimo wielu lat ich intensywnego prowadzenia w wielu laboratoriach na świecie, nie przyniosły wymiernych, satysfakcjonujących wyników prób ich zastosowań w klinice, u pacjentów cierpiących na udar niedokrwienno. Należy już w tym miejscu zaznaczyć, że jeżeli udałoby się uzyskać skuteczny neuroprotektant, prawdopodobnie

miałby on bardzo ważne zastosowanie także w sytuacjach klinicznych innych niż sam udar niedokrwienny lub krwotoczny. W pierwszej kolejności można w tym kontekście wymienić mechaniczne uszkodzenia mózgu w wypadkach komunikacyjnych, albo w wypadkach podczas aktywności sportowych i rekreacyjnych. Równie ważne byłoby zastosowanie neuroprotekcji w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak na przykład choroba Alzheimera lub Parkinsona lecz niewątpliwie również w przebiegu chorób psychiatrycznych, bowiem wszystkie wymienione wyżej sytuacje kliniczne, mają wspólne elementy w swoich patofizjologiach. W tym świetle, lek – skuteczny i bezpieczny neuroprotektant zyskałby także szczególny społeczny odbiór.

## 6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. W korze mózgowej szczurów SHAM szczepu SHR zaobserwowano zmniejszenie gęstości naczyń mikrokrążenia w porównaniu z gęstością tych naczyń u szczurów szczepu SD oraz znaczną liczbę naczyń z przeciekiem surowicy.
2. Po 90-minutowym niedokrwieniu i 72-godzinnej reperfuzji mózgu u szczurów normotensyjnych SD i szczurów z nadciśnieniem tętniczym SHR stwierdzono:
  - a) większe uszkodzenie mózgu u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, niż u szczurów normotensyjnych;
  - b) porównywalne u obu szczepów szczurów zaburzenia chodu w teście CatWalk i zmniejszenie spontanicznej ruchliwości w teście otwartego pola;
  - c) większe zaburzenia regulacji mikrokrążenia w korze mózgowej w strefie półcienia ischemicznego u szczurów SHR niż u szczurów SD;
  - d) zmniejszenie gęstości naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej w strefie półcienia ischemicznego u obu szczepów szczurów;
  - e) zwiększenie liczby przeciekających naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej w strefie półcienia ischemicznego.
3. Selektywny agonista receptorów Y2 – (NPY 13-36) podany w dawce 10 µg do komory bocznej mózgu:
  - f) poprawia ukrwienie strefy półcienia u szczurów szczepu SD w czasie trwania niedokrwienia;
  - g) zmniejsza wielkość poniedokrwiennej martwicy mózgu w takim samym stopniu u obu szczepów szczurów, z jednakową skutecznością zarówno po podaniu w czasie niedokrwienia jak i w czasie reperfuzji mózgu;
  - h) usprawnia chód u obu szczepów szczurów zarówno po podaniu w czasie niedokrwienia jak i w czasie reperfuzji mózgu, ale nie poprawia spontanicznej aktywności ruchowej badanych zwierząt;
  - i) selektywnie poprawia regulację mikrokrążenia w korze mózgowej w strefie półcienia ischemicznego szczurów szczepu SHR jedynie po podaniu w okresie reperfuzji;
  - j) zwiększa gęstość naczyń mikrokrążenia w korze mózgowej w strefie półcienia ischemicznego u obu szczepów szczurów zarówno po podaniu w czasie niedokrwienia jak i w czasie reperfuzji mózgu.

## **7. WNIOSKI**

1. Selektywny agonista receptorów Y2 – (NPY 13-36) chroni niedokrwiony mózg przed uszkodzeniem reperfuzyjnym u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, najprawdopodobniej przez zmniejszenie stresu nitrozacyjno/oksydacyjnego.
2. W ochronnym działaniu NPY(13-36) istnieje okno terapeutyczne umożliwiające osiągnięcie neuroprotekcji poprzez poprawę ukrwienia na poziomie mikrokążeń, po podaniu tego peptydu w czasie reperfuzji mózgu.
3. Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za poprawę mikrokążenia w okresie reperfuzji wydaje się być pobudzenie angiogenezy, co wyraża się zwiększeniem gęstości najmniejszych naczyń charakteryzujących się nieszczelnością.



## 8. PIŚMIENNICTWO

- ❖ Abe, K., Tilan, J.U., Zukowska, Z., 2007. NPY and NPY receptors in vascular remodeling. *Curr Top Med Chem* 7, 1704–1709.
- ❖ Abounader, R., Elhousseiny, A., Cohen, Z., Olivier, A., Stanimirovic, D., Quirion, R., Hamel, E., 1999. Expression of neuropeptide Y receptors mRNA and protein in human brain vessels and cerebromicrovascular cells in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 155–163.
- ❖ Acuna-Goycolea, C., Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Obata, K., van den Pol, A.N., 2005. Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus. *J Neurosci* 25, 7406–7419.
- ❖ Adolph, O., Köster, S., Räth, M., Georgieff, M., Weigt, H.U., Engele, J., Senftleben, U., Föhr, K.J., 2007. Rapid increase of glial glutamate uptake via blockade of the protein kinase A pathway. *Glia* 55, 1699–1707.
- ❖ Almohanna, A.M., Wray, S., 2018. Hypoxic conditioning in blood vessels and smooth muscle tissues: effects on function, mechanisms, and unknowns. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315, H756–H770.
- ❖ Ammar, D.A., Eadie, D.M., Wong, D.J., Ma, Y.Y., Kolakowski, L.F., Yang-Feng, T.L., Thompson, D.A., 1996. Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. *Genomics* 38, 392–398.
- ❖ Arai, K., Jin, G., Navaratna, D., Lo, E.H., 2009. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J* 276, 4644–4652.
- ❖ Armstrong, D.M., Drew, T., 1984. Discharges of pyramidal tract and other motor cortical neurones during locomotion in the cat. *J Physiol* 346, 471–495.
- ❖ Aronowski, J., Strong, R., Grotta, J.C., 1997. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17, 1048–1056.
- ❖ Badrichani, A.Z., Stroka, D.M., Bilbao, G., Curiel, D.T., Bach, F.H., Ferran, C., 1999. Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest* 103, 543–553.
- ❖ Balaban, B., Tok, F., 2014. Gait disturbances in patients with stroke. *PM R* 6, 635–642.
- ❖ Bartus, R.T., Baker, K.L., Heiser, A.D., Sawyer, S.D., Dean, R.L., Elliott, P.J., Straub, J.A., 1994. Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 14, 537–544.
- ❖ Bastide, M., Bordet, R., Pu, Q., Robin, E., Puisieux, F., Dupuis, B., 1999. Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1309–1315.
- ❖ Baumbach, G.L., Heistad, D.D., 1988. Cerebral circulation in chronic arterial hypertension. *Hypertension* 12, 89–95.
- ❖ Bechara, C., Sagan, S., 2013. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett* 587, 1693–1702.
- ❖ Beck, H., Plate, K.H., 2009. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 117, 481–496.
- ❖ Beckman, J.S., Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, C1424–1437.

- ❖ Bederson, J.B., Pitts, L.H., Germano, S.M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H.M., 1986. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17, 1304–1308.
- ❖ Benarroch, E.E., 2009. Neuropeptide Y: its multiple effects in the CNS and potential clinical significance. *Neurology* 72, 1016–1020.
- ❖ Bergantin, L.B., Jurkiewicz, A., García, A.G., Caricati-Neto, A., 2015. A Calcium Paradox in the Context of Neurotransmission.
- ❖ Bettio, A., Beck-Sickinger, A.G., 2001. Biophysical methods to study ligand-receptor interactions of neuropeptide Y. *Biopolymers* 60, 420–437.
- ❖ Boehme, A.K., Esenwa, C., Elkind, M.S.V., 2017. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res* 120, 472–495.
- ❖ Bomfim, G.F., Dos Santos, R.A., Oliveira, M.A., Giachini, F.R., Akamine, E.H., Tostes, R.C., Fortes, Z.B., Webb, R.C., Carvalho, M.H.C., 2012. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 122, 535–543.
- ❖ Bramlett, H.M., Dietrich, W.D., 2004. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 133–150.
- ❖ Brothers, S.P., Wahlestedt, C., 2010. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. *EMBO Mol Med* 2, 429–439.
- ❖ Brown, L.S., Foster, C.G., Courtney, J.-M., King, N.E., Howells, D.W., Sutherland, B.A., 2019. Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front Cell Neurosci* 13, 282.
- ❖ Bundo, M., Inao, S., Nakamura, A., Kato, T., Ito, K., Tadokoro, M., Kabeya, R., Sugimoto, T., Kajita, Y., Yoshida, J., 2002. Changes of Neural Activity Correlate With the Severity of Cortical Ischemia in Patients With Unilateral Major Cerebral Artery Occlusion. *Stroke* 33, 61–66.
- ❖ Busto, R., Dietrich, W.D., Globus, M.Y., Valdés, I., Scheinberg, P., Ginsberg, M.D., 1987. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 7, 729–738.
- ❖ Busto, R., Globus, M.Y., Dietrich, W.D., Martinez, E., Valdés, I., Ginsberg, M.D., 1989. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20, 904–910.
- ❖ Caberlotto, L., Fuxe, K., Rimland, J.M., Sedvall, G., Hurd, Y.L., 1998. Regional distribution of neuropeptide Y Y2 receptor messenger RNA in the human post mortem brain. *Neuroscience* 86, 167–178.
- ❖ Caputa, M., 2006. Animal responses to extreme conditions: a lesson to biomedical research. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 8, 7–15.
- ❖ Chapin, J.K., Woodward, D.J., 1981. Modulation of sensory responsiveness of single somatosensory cortical cells during movement and arousal behaviors. *Exp Neurol* 72, 164–178.
- ❖ Chavez-Noriega, L.E., Stevens, C.F., 1994. Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylate cyclase in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 14, 310–317.
- ❖ Chen, I.I., Prewitt, R.L., Dowell, R.F., 1981. Microvascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat cremaster muscle. *Am J Physiol* 241, H306-310.
- ❖ Chen, S., Li, G., Zhang, W., Wang, J., Sigmund, C.D., Olson, J.E., Chen, Y., 2009. Ischemia-induced brain damage is enhanced in human renin and angiotensinogen double-transgenic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297, R1526-1531.
- ❖ Choi, D.W., 2020. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. *Front Neurosci* 14, 579953.

- ❖ Cipolla, M.J., Liebeskind, D.S., Chan, S.-L., 2018a. The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 38, 2129–2149.
- ❖ Cipolla, M.J., Linfante, I., Abuchowski, A., Jubin, R., Chan, S.-L., 2018b. Pharmacologically increasing collateral perfusion during acute stroke using a carboxyhemoglobin gas transfer agent (Sanguinate™) in spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 38, 755–766.
- ❖ Cohen, D.L., Kearney, R., Griffiths, M., Nadesalingam, V., Bathula, R., 2015. Around 9% of patients with ischaemic stroke are suitable for thrombectomy. *BMJ* 351, h4607.
- ❖ Colwell, C.S., Levine, M.S., 1995. Excitatory synaptic transmission in neostriatal neurons: regulation by cyclic AMP-dependent mechanisms. *J Neurosci* 15, 1704–1713.
- ❖ Cooper, D.M., Mons, N., Karpen, J.W., 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374, 421–424.
- ❖ Datta, S.R., Griendling, K.K., 2010. Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. *Hypertension* 56, 325–330.
- ❖ Dave, K.R., Christian, S.L., Perez-Pinzon, M.A., Drew, K.L., 2012. Neuroprotection: Lessons from hibernators. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 162, 1–9.
- ❖ del Zoppo, G.J., 2010. The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Intern Med* 267, 156–171.
- ❖ del Zoppo, G.J., 2009. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 158, 972–982.
- ❖ del Zoppo, G.J., Mabuchi, T., 2003. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 879–894.
- ❖ del Zoppo, G.J., Sharp, F.R., Heiss, W.-D., Albers, G.W., 2011. Heterogeneity in the penumbra. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 1836–1851.
- ❖ Dirnagl, U., 2006. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 1465–1478.
- ❖ Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397.
- ❖ Dirnagl, U., Simon, R.P., Hallenbeck, J.M., 2003. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26, 248–254.
- ❖ Dobkin, B.H., 1991. The rehabilitation of elderly stroke patients. *Clin Geriatr Med* 7, 507–523.
- ❖ Domańska-Janik, K., Pylova, S., 1992. Postreceptor modulation of cAMP accumulation in rat brain particulate fraction after ischemia--involvement of protein kinase C. *Mol Chem Neuropathol* 17, 65–77.
- ❖ Dombeck, D.A., Graziano, M.S., Tank, D.W., 2009. Functional clustering of neurons in motor cortex determined by cellular resolution imaging in awake behaving mice. *J Neurosci* 29, 13751–13760.
- ❖ Dombeck, D.A., Khabbaz, A.N., Collman, F., Adelman, T.L., Tank, D.W., 2007. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* 56, 43–57.
- ❖ Domin, H., Przykaza, Ł., Jantas, D., Kozniewska, E., Boguszewski, P.M., Śmiałowska, M., 2017. Neuropeptide Y Y2 and Y5 receptors as promising targets for neuroprotection in primary neurons exposed to oxygen-glucose deprivation and in transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 344, 305–325.
- ❖ Dreier, J.P., 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 17, 439–447.
- ❖ Du, Y., Wang, W., Lutton, A.D., Kiyoshi, C.M., Ma, B., Taylor, A.T., Olesik, J.W., McTigue, D.M., Askwith, C.C., Zhou, M., 2018. Dissipation of transmembrane potassium gradient is the main cause of cerebral ischemia-induced depolarization in astrocytes and neurons. *Exp Neurol* 303, 1–11.

- ❖ Durukan, A., Tatlisumak, T., 2007. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87, 179–197.
- ❖ Duverger, D., MacKenzie, E.T., 1988. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab* 8, 449–461.
- ❖ Eaton, K., Sallee, F.R., Sah, R., 2007. Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. *Curr Top Med Chem* 7, 1645–1659.
- ❖ Encarnacion, A., Horie, N., Keren-Gill, H., Bliss, T.M., Steinberg, G.K., Shamloo, M., 2011. Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. *J Neurosci Methods* 196, 247–257.
- ❖ Ergul, A., Alhusban, A., Fagan, S.C., 2012. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke. *Stroke* 43, 2270–2274.
- ❖ European Stroke Initiative Executive Committee, EUSI Writing Committee, Olsen, T.S., Langhorne, P., Diener, H.C., Hennerici, M., Ferro, J., Sivenius, J., Wahlgren, N.G., Bath, P., 2003. European Stroke Initiative Recommendations for Stroke Management-update 2003. *Cerebrovasc Dis* 16, 311–337.
- ❖ Fatoba, O., Kloster, E., Reick, C., Saft, C., Gold, R., Epplen, J.T., Arning, L., Ellrichmann, G., 2018. Activation of NPY-Y2 receptors ameliorates disease pathology in the R6/2 mouse and PC12 cell models of Huntington's disease. *Exp Neurol* 302, 112–128.
- ❖ Fluri, F., Schuhmann, M.K., Kleinschnitz, C., 2015. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* 9, 3445–3454.
- ❖ Fujita, K., Tanaka, K., Yamagami, H., Ide, T., Ishiyama, H., Sonoda, K., Satow, T., Takahashi, J.C., Ihara, M., Koga, M., Yokota, T., Toyoda, K., 2019. Detrimental Effect of Chronic Hypertension on Leptomeningeal Collateral Flow in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 50, 1751–1757.
- ❖ Garcia, J., Dang, J., Habib, P., Beyer, C., Kipp, M., 2013. Comparison of infarct volume and behavioral deficit in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rat after transient occlusion of the middle cerebral artery. *Springerplus* 2, 414.
- ❖ GBD 2019 Stroke Collaborators, 2021. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol* 20, 795–820.
- ❖ Ghamari-Langroudi, M., Colmers, W.F., Cone, R.D., 2005. PYY3-36 inhibits the action potential firing activity of POMC neurons of arcuate nucleus through postsynaptic Y2 receptors. *Cell Metab* 2, 191–199.
- ❖ Ghersi, G., Chen, W., Lee, E.W., Zukowska, Z., 2001. Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. *Peptides* 22, 453–458.
- ❖ Ginsberg, M.D., 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55, 363–389.
- ❖ Girotra, T., Lekoubou, A., Bishu, K.G., Ovbiagele, B., 2020. A contemporary and comprehensive analysis of the costs of stroke in the United States. *J Neurol Sci* 410, 116643.
- ❖ Goumain, M., Voisin, T., Lorinet, A.M., Ducroc, R., Tsocas, A., Rozé, C., Rouet-Benzineb, P., Herzog, H., Balasubramaniam, A., Laburthe, M., 2001. The peptide YY-preferring receptor mediating inhibition of small intestinal secretion is a peripheral Y(2) receptor: pharmacological evidence and molecular cloning. *Mol Pharmacol* 60, 124–134.
- ❖ Granger, D.N., Kvietys, P.R., 2017. Reperfusion therapy-What's with the obstructed, leaky and broken capillaries? *Pathophysiology* 24, 213–228.

- ❖ Guidotti, G., Brambilla, L., Rossi, D., 2017. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol Sci* 38, 406–424.
- ❖ Guillet, B.A., Velly, L.J., Canolle, B., Masméjean, F.M., Nieoullon, A.L., Pisano, P., 2005. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* 46, 337–346.
- ❖ Gursoy-Ozdemir, Y., Qiu, J., Matsuoka, N., Bolay, H., Bermpohl, D., Jin, H., Wang, X., Rosenberg, G.A., Lo, E.H., Moskowitz, M.A., 2004. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest* 113, 1447–1455.
- ❖ Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K.R., Medeghri, Z., Machnig, T., Schneider, D., von Kummer, R., Wahlgren, N., Toni, D., ECASS Investigators, 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359, 1317–1329.
- ❖ Hamers, F.P., Lankhorst, A.J., van Laar, T.J., Veldhuis, W.B., Gispen, W.H., 2001. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J Neurotrauma* 18, 187–201.
- ❖ Hayashi, T., Noshita, N., Sugawara, T., Chan, P.H., 2003. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 166–180.
- ❖ Herbin, M., Gasc, J.-P., Renous, S., 2006. How does a mouse increase its velocity? A model for investigation in the control of locomotion. *Comptes Rendus Palevol, Cent ans après Marey : Aspects de la morphologie fonctionnelle aujourd'hui* 5, 531–540.
- ❖ Herbin, M., Gasc, J.-P., Renous, S., 2004. Symmetrical and asymmetrical gaits in the mouse: patterns to increase velocity. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190, 895–906.
- ❖ Hernandez-Ontiveros, D.G., Tajiri, N., Acosta, S., Giunta, B., Tan, J., Borlongan, C.V., 2013. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol* 4, 30.
- ❖ Hökfelt, T., Bartfai, T., Bloom, F., 2003. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol* 2, 463–472.
- ❖ Hökfelt, T., Broberger, C., Zhang, X., Diez, M., Kopp, J., Xu, Z., Landry, M., Bao, L., Schalling, M., Koistinaho, J., DeArmond, S.J., Prusiner, S., Gong, J., Walsh, J.H., 1998. Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in the normal and diseased nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 154–166.
- ❖ Holzer, P., Reichmann, F., Farzi, A., 2012. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides* 46, 261–274.
- ❖ Hossmann, K.-A., 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1057–1083.
- ❖ Iadecola, C., 2017. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 96, 17–42.
- ❖ Iadecola, C., Anrather, J., 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796–808.
- ❖ Iadecola, C., Davisson, R.L., 2008. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab* 7, 476–484.
- ❖ Iadecola, C., Gottesman, R.F., 2019. Neurovascular and Cognitive Dysfunction in Hypertension. *Circ Res* 124, 1025–1044.
- ❖ Jourquin, J., Tremblay, E., Décanis, N., Charton, G., Hanessian, S., Chollet, A.-M., Le Diguardher, T., Khrestchatsky, M., Rivera, S., 2003. Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci* 18, 1507–1517.

- ❖ Kanazawa, M., Takahashi, T., Ishikawa, M., Onodera, O., Shimohata, T., Del Zoppo, G.J., 2019. Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target? *J Cereb Blood Flow Metab* 39, 753–769.
- ❖ Kilic, E., Kilic, U., Bacigaluppi, M., Guo, Z., Abdallah, N.B., Wolfer, D.P., Reiter, R.J., Hermann, D.M., Bassetti, C.L., 2008. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* 45, 142–148.
- ❖ Kim, J., Thayabaranathan, T., Donnan, G.A., Howard, G., Howard, V.J., Rothwell, P.M., Feigin, V., Norrving, B., Owolabi, M., Pandian, J., Liu, L., Cadilhac, D.A., Thrift, A.G., 2020. Global Stroke Statistics 2019. *Int J Stroke* 15, 819–838.
- ❖ Kitchen, P., Salman, M.M., Halsey, A.M., Clarke-Bland, C., MacDonald, J.A., Ishida, H., Vogel, H.J., Almutiri, S., Logan, A., Kreida, S., Al-Jubair, T., Winkel Missel, J., Gourdon, P., Törnroth-Horsefield, S., Conner, M.T., Ahmed, Z., Conner, A.C., Bill, R.M., 2020. Targeting Aquaporin-4 Subcellular Localization to Treat Central Nervous System Edema. *Cell* 181, 784-799.e19.
- ❖ Kontos, H.A., Raper, A.J., Patterson, J.L., 1977. Analysis of vasoactivity of local pH, PCO<sub>2</sub> and bicarbonate on pial vessels. *Stroke* 8, 358–360.
- ❖ Koundal, S., Liu, X., Sanggaard, S., Mortensen, K., Wardlaw, J., Nedergaard, M., Benveniste, H., Lee, H., 2019. Brain Morphometry and Longitudinal Relaxation Time of Spontaneously Hypertensive Rats (SHRs) in Early and Intermediate Stages of Hypertension Investigated by 3D VFA-SPGR MRI. *Neuroscience* 404, 14–26.
- ❖ Koźniewska, E., Osęka, M., Styś, T., 1992. Effects of Endothelium-Derived Nitric Oxide on Cerebral Circulation during Normoxia and Hypoxia in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 311–317.
- ❖ Krivánek, J., 1983. Vanadate and brain adenylyate cyclase. Effect of spreading depression. *Neuroscience* 10, 545–552.
- ❖ Krivánek, J., 1976. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat cerebral cortex: effect of potassium ions in vivo (cortical spreading depression). *J Neurochem* 26, 413–415.
- ❖ Krupiński, J., Kałuża, J., Kumar, P., Kumar, S., Wang, J.M., 1993. Some remarks on the growth-rate and angiogenesis of microvessels in ischemic stroke. Morphometric and immunocytochemical studies. *Patol Pol* 44, 203–209.
- ❖ Kuklina, E.V., Tong, X., George, M.G., Bansil, P., 2012. Epidemiology and prevention of stroke: a worldwide perspective. *Expert Rev Neurother* 12, 199–208.
- ❖ KUNZ, A., IADECOLA, C., 2009. Cerebral vascular dysregulation in the ischemic brain. *Handb Clin Neurol* 92, 283–305.
- ❖ Kuroda, S., Siesjö, B.K., 1997. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci* 4, 199–212.
- ❖ Labelle, M., St-Pierre, S., Savard, R., Boulanger, Y., 1997. Solution structure of neuropeptide tyrosine 13-36, a Y2 receptor agonist, as determined by NMR. *Eur J Biochem* 246, 780–785.
- ❖ Larhammar, D., 1996. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept* 65, 165–174.
- ❖ Ledri, M., Sørensen, A.T., Madsen, M.G., Christiansen, S.H., Ledri, L.N., Cifra, A., Bengzon, J., Lindberg, E., Pinborg, L.H., Jespersen, B., Gøtzsche, C.R., Woldbye, D.P.D., Andersson, M., Kokaia, M., 2015. Differential Effect of Neuropeptides on Excitatory Synaptic Transmission in Human Epileptic Hippocampus. *J Neurosci* 35, 9622–9631.
- ❖ Lee, E.W., Michalkiewicz, M., Kitlinska, J., Kalezic, I., Switalska, H., Yoo, P., Sangkharat, A., Ji, H., Li, L., Michalkiewicz, T., Ljubisavljevic, M., Johansson, H., Grant, D.S., Zukowska, Z., 2003. Neuropeptide Y induces ischemic angiogenesis and restores function of ischemic skeletal muscles. *J Clin Invest* 111, 1853–1862.

- ❖ Lee, R.H.-C., Wu, C.Y.-C., Citadin, C.T., Couto E Silva, A., Possoit, H.E., Clemons, G.A., Acosta, C.H., de la Llama, V.A., Neumann, J.T., Lin, H.W., 2022. Activation of Neuropeptide Y2 Receptor Can Inhibit Global Cerebral Ischemia-Induced Brain Injury. *Neuromolecular Med* 24, 97–112.
- ❖ Leis, J.A., Bekar, L.K., Walz, W., 2005. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 50, 407–416.
- ❖ Leist, M., Nicotera, P., 1998. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* 239, 183–201.
- ❖ Lenart, B., Kintner, D.B., Shull, G.E., Sun, D., 2004. Na-K-Cl cotransporter-mediated intracellular Na<sup>+</sup> accumulation affects Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes in an in vitro ischemic model. *J Neurosci* 24, 9585–9597.
- ❖ Levy, D.E., Brott, T.G., Haley, E.C., Marler, J.R., Sheppard, G.L., Barsan, W., Broderick, J.P., 1994. Factors related to intracranial hematoma formation in patients receiving tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke. *Stroke* 25, 291–297.
- ❖ Li, C., Wu, X., Liu, S., Zhao, Y., Zhu, J., Liu, K., 2019. Roles of Neuropeptide Y in Neurodegenerative and Neuroimmune Diseases. *Front Neurosci* 13, 869.
- ❖ Li, J., Henman, M.C., Tatlisumak, T., Shaw, G.G., Doyle, K.M., 2005. The pre-ischaemic neuroprotective effects of N1-dansyl-spermine in a transient focal cerebral ischaemia model in mice. *Brain Res* 1055, 180–185.
- ❖ Lindauer, U., Kunz, A., Schuh-Hofer, S., Vogt, J., Dreier, J.P., Dirnagl, U., 2001. Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arterial pH reactivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H1353-1363.
- ❖ Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R., 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84–91.
- ❖ Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A., 1997. Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. *Genomics* 41, 498–500.
- ❖ Lyden, P., Buchan, A., Boltze, J., Fisher, M., STAIR XI Consortium\*, 2021. Top Priorities for Cerebroprotective Studies-A Paradigm Shift: Report From STAIR XI. *Stroke* 52, 3063–3071.
- ❖ Major, S., Petzold, G.C., Reiffurth, C., Windmüller, O., Foddiss, M., Lindauer, U., Kang, E.-J., Dreier, J.P., 2017. A role of the sodium pump in spreading ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 1687–1705.
- ❖ Mantyh, P.W., Allen, C.J., Rogers, S., DeMaster, E., Ghilardi, J.R., Mosconi, T., Kruger, L., Mannon, P.J., Taylor, I.L., Vigna, S.R., 1994. Some sensory neurons express neuropeptide Y receptors: potential paracrine inhibition of primary afferent nociceptors following peripheral nerve injury. *J Neurosci* 14, 3958–3968.
- ❖ Markgraf, C.G., Velayo, N.L., Johnson, M.P., McCarty, D.R., Medhi, S., Koehl, J.R., Chmielewski, P.A., Linnik, M.D., 1998. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29, 152–158.
- ❖ Matute, C., Domercq, M., Sánchez-Gómez, M.-V., 2006. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia* 53, 212–224.
- ❖ McCarthy, C.G., Goulopoulou, S., Wenceslau, C.F., Spitler, K., Matsumoto, T., Webb, R.C., 2014. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H184-196.
- ❖ Menyhárt, Á., Farkas, A.E., Varga, D.P., Frank, R., Tóth, R., Bálint, A.R., Makra, P., Dreier, J.P., Bari, F., Krizbai, I.A., Farkas, E., 2018. Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels are potently involved in the inverse neurovascular response to spreading depolarization. *Neurobiol Dis* 119, 41–52.

- ❖ Menyhárt, Á., Zölei-Szénási, D., Puskás, T., Makra, P., Orsolya, M.T., Szepes, B.É., Tóth, R., Ivánkovits-Kiss, O., Obrenovitch, T.P., Bari, F., Farkas, E., 2017. Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced tissue acidosis in the young and aged rat brain. *Sci Rep* 7, 1154.
- ❖ Merritt, K., Egerton, A., Kempton, M.J., Taylor, M.J., McGuire, P.K., 2016. Nature of Glutamate Alterations in Schizophrenia: A Meta-analysis of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Studies. *JAMA Psychiatry* 73, 665–674.
- ❖ Michel, M.C., Beck-Sickinger, A., Cox, H., Doods, H.N., Herzog, H., Larhammar, D., Quirion, R., Schwartz, T., Westfall, T., 1998. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev* 50, 143–150.
- ❖ Michiels, C., Arnould, T., Remacle, J., 2000. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta* 1497, 1–10.
- ❖ Miller, A.A., Dusting, G.J., Roulston, C.L., Sobey, C.G., 2006. NADPH-oxidase activity is elevated in penumbral and non-ischemic cerebral arteries following stroke. *Brain Res* 1111, 111–116.
- ❖ Miller, D.J., Simpson, J.R., Silver, B., 2011. Safety of thrombolysis in acute ischemic stroke: a review of complications, risk factors, and newer technologies. *Neurohospitalist* 1, 138–147.
- ❖ Milton, M., Smith, P.D., 2018. It's All about Timing: The Involvement of Kir4.1 Channel Regulation in Acute Ischemic Stroke Pathology. *Front Cell Neurosci* 12, 36.
- ❖ Mittapalli, G.K., Roberts, E., 2014. Ligands of the neuropeptide Y Y2 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 24, 430–441.
- ❖ Murfee, W.L., Schmid-Schönbein, G.W., 2008. Chapter 12. Structure of microvascular networks in genetic hypertension. *Methods Enzymol* 444, 271–284.
- ❖ Nakamura, M., Aoki, Y., Hirano, D., 1996. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mouse type 2 neuropeptide Y receptor. *Biochim Biophys Acta* 1284, 134–137.
- ❖ Nardi, K., Leys, D., Eusebi, P., Cordonnier, C., Gautier, S., Hénon, H., Bordet, R., 2011. Influence of Lipid Profiles on the Risk of Hemorrhagic Transformation after Ischemic Stroke: Systematic Review. *Cerebrovasc Dis Extra* 1, 130–141.
- ❖ Neuhaus, A.A., Couch, Y., Hadley, G., Buchan, A.M., 2017. Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility. *Brain* 140, 2079–2092.
- ❖ Nishizaki, T., Nagai, K., Nomura, T., Tada, H., Kanno, T., Tozaki, H., Li, X.X., Kondoh, T., Kodama, N., Takahashi, E., Sakai, N., Tanaka, K., Saito, N., 2002. A new neuromodulatory pathway with a glial contribution mediated via A(2a) adenosine receptors. *Glia* 39, 133–147.
- ❖ O'Collins, V.E., Donnan, G.A., Macleod, M.R., Howells, D.W., 2013. Hypertension and experimental stroke therapies. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1141–1147.
- ❖ Okada, Y., Copeland, B.R., Mori, E., Tung, M.M., Thomas, W.S., del Zoppo, G.J., 1994. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 25, 202–211.
- ❖ Olah, L., Franke, C., Schwindt, W., Hoehn, M., 2000. CO(2) reactivity measured by perfusion MRI during transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31, 2236–2244.
- ❖ Ono, Y., Morikawa, S., Inubushi, T., Shimizu, H., Yoshimoto, T., 1997. T2\*-weighted magnetic resonance imaging of cerebrovascular reactivity in rat reversible focal cerebral ischemia. *Brain Res* 744, 207–215.
- ❖ Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315–424.
- ❖ Paiardi, S., Rodella, L.F., De Ciuceis, C., Porteri, E., Boari, G.E.M., Rezzani, R., Rizzardi, N., Platto, C., Tiberio, G.A.M., Giulini, S.M., Rizzoni, D., Agabiti-Rosei, E., 2009.



Immunohistochemical evaluation of microvascular rarefaction in hypertensive humans and in spontaneously hypertensive rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 42, 259–268.

- ❖ Palomares, S.M., Cipolla, M.J., 2011. Vascular Protection Following Cerebral Ischemia and Reperfusion. *J Neurol Neurophysiol* 2011, S1-004.
- ❖ Pan, W., Kastin, A.J., 2007. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol* 83, 363–374.
- ❖ Parker, R.M., Herzog, H., 1999. Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neurosci* 11, 1431–1448.
- ❖ Parkkinen, S., Ortega, F.J., Kuptsova, K., Huttunen, J., Tarkka, I., Jolkkonen, J., 2013. Gait impairment in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke Res Treat* 2013, 410972.
- ❖ Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*, 2nd edition. ed. Academic Pr, Sydney Orlando.
- ❖ Pedragosa-Badia, X., Stichel, J., Beck-Sickinger, A.G., 2013. Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 5.
- ❖ Peng, S., Kuang, Z., Zhang, Y., Xu, H., Cheng, Q., 2011. The protective effects and potential mechanism of Calpain inhibitor Calpeptin against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Mol Biol Rep* 38, 905–912.
- ❖ Pétrault, O., Bastide, M., Cotelle, N., Gelé, P., Gautier, S., Laprais, M., Vamecq, J., Duriez, P., Bordet, R., 2004. The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylhydroxyphenyl is parallel to the preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370, 395–403.
- ❖ Pietrobon, D., Moskowitz, M.A., 2014. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci* 15, 379–393.
- ❖ Postolache, T.T., Wadhawan, A., Can, A., Lowry, C.A., Woodbury, M., Makkar, H., Hoisington, A.J., Scott, A.J., Potocki, E., Benros, M.E., Stiller, J.W., 2020. Inflammation in Traumatic Brain Injury. *J Alzheimers Dis* 74, 1–28.
- ❖ Przykaza, Ł., 2021. Understanding the Connection Between Common Stroke Comorbidities, Their Associated Inflammation, and the Course of the Cerebral Ischemia/Reperfusion Cascade. *Front Immunol* 12, 782569.
- ❖ Przykaza, Ł., Kozniewska, E., 2022. Ligands of the Neuropeptide Y Y2 Receptors as a Potential Multitarget Therapeutic Approach for the Protection of the Neurovascular Unit Against Acute Ischemia/Reperfusion: View from the Perspective of the Laboratory Bench. *Transl Stroke Res* 13, 12–24.
- ❖ Raciborski, F., Gujski, M., Gawinska, E., Klak, A., Slowik, A., Wnuk, M., Instytut Ochrony Zdrowia, 2016. *Udary mózgu: rosnący problem w starzejącym się społeczeństwie*. Instytut Ochrony Zdrowia, Warszawa.
- ❖ Radermacher, K.A., Wingler, K., Langhauser, F., Altenhöfer, S., Kleikers, P., Hermans, J.J.R., Hrabě de Angelis, M., Kleinschnitz, C., Schmidt, H.H.H.W., 2013. Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 18, 1418–1427.
- ❖ Reichmann, F., Holzer, P., 2016. Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides* 55, 99–109.
- ❖ Ritter, L.S., Orozco, J.A., Coull, B.M., McDonagh, P.F., Rosenblum, W.I., 2000. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 31, 1153–1161.
- ❖ Robich, M.P., Matyal, R., Chu, L.M., Feng, J., Xu, S.-H., Laham, R.J., Hess, P.E., Bianchi, C., Sellke, F.W., 2010. Effects of neuropeptide Y on collateral development in a swine model of chronic myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 49, 1022–1030.
- ❖ Sakoh, M., Gjedde, A., 2003. Neuroprotection in hypothermia linked to redistribution of oxygen in brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H17-25.

- ❖ Salinet, A.S., Silva, N.C., Caldas, J., de Azevedo, D.S., de-Lima-Oliveira, M., Nogueira, R.C., Conforto, A.B., Texeira, M.J., Robinson, T.G., Panerai, R.B., Bor-Seng-Shu, E., 2019. Impaired cerebral autoregulation and neurovascular coupling in middle cerebral artery stroke: Influence of severity? *J Cereb Blood Flow Metab* 39, 2277–2285.
- ❖ Samaniego, E.A., Linfante, I., Dabus, G., 2012. Intra-arterial thrombolysis: tissue plasminogen activator and other thrombolytic agents. *Tech Vasc Interv Radiol* 15, 41–46.
- ❖ Santisteban, M.M., Iadecola, C., 2018. Hypertension, dietary salt and cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* 38, 2112–2128.
- ❖ Saraf, R., Mahmood, F., Amir, R., Matyal, R., 2016. Neuropeptide Y is an angiogenic factor in cardiovascular regeneration. *Eur J Pharmacol* 776, 64–70.
- ❖ Schaller, B., Graf, R., 2003. Hypothermia and stroke: the pathophysiological background. *Pathophysiology* 10, 7–35.
- ❖ Schultz, S.K., Castillo, C.S., Kosier, J.T., Robinson, R.G., 1997. Generalized anxiety and depression. Assessment over 2 years after stroke. *Am J Geriatr Psychiatry* 5, 229–237.
- ❖ Schultz, S.K., O’Leary, D.S., Boles Ponto, L.L., Arndt, S., Magnotta, V., Watkins, G.L., Hichwa, R.D., Andreasen, N.C., 2002. Age and regional cerebral blood flow in schizophrenia: age effects in anterior cingulate, frontal, and parietal cortex. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14, 19–24.
- ❖ Seitz, I., Dirnagl, U., Lindauer, U., 2004. Impaired vascular reactivity of isolated rat middle cerebral artery after cortical spreading depression in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 526–530.
- ❖ Shah, Q.A., Georgiadis, A., Suri, M.F.K., Rodriguez, G., Qureshi, A.I., 2007. Preliminary experience with intra-arterial nicardipine in patients with acute ischemic stroke. *Neurocrit Care* 7, 53–57.
- ❖ Shaw, J.L., Gackenhaimer, S.L., Gehlert, D.R., 2003. Functional autoradiography of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptor subtypes in rat brain using agonist stimulated [35S]GTPgammaS binding. *J Chem Neuroanat* 26, 179–193.
- ❖ Smiałowska, M., Domin, H., Zieba, B., Koźniewska, E., Michalik, R., Piotrowski, P., Kajta, M., 2009. Neuroprotective effects of neuropeptide Y-Y2 and Y5 receptor agonists in vitro and in vivo. *Neuropeptides* 43, 235–249.
- ❖ Sokolova, I.A., Manukhina, E., Blinkov, S.M., Koshelev, V., Pinelis, V., Rodionov, I.M., 1985. Rarefaction of the arterioles and capillary network in the brain of rats with different forms of hypertension. *Microvascular research* 30, 1–9.
- ❖ Song, Y., Gunnarson, E., 2012. Potassium dependent regulation of astrocyte water permeability is mediated by cAMP signaling. *PLoS One* 7, e34936.
- ❖ Stanić, D., Brumovsky, P., Fetissof, S., Shuster, S., Herzog, H., Hökfelt, T., 2006. Characterization of neuropeptide Y2 receptor protein expression in the mouse brain. I. Distribution in cell bodies and nerve terminals. *J Comp Neurol* 499, 357–390.
- ❖ Su, G., Kintner, D.B., Flagella, M., Shull, G.E., Sun, D., 2002. Astrocytes from Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C1147-1160.
- ❖ Sun, Q.Q., Huguenard, J.R., Prince, D.A., 2001. Neuropeptide Y receptors differentially modulate G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels and high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in rat thalamic neurons. *J Physiol* 531, 67–79.
- ❖ Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X.O., Logvinova, A., Greenberg, D.A., 2003. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111, 1843–1851.
- ❖ Sussman, E.S., Connolly, E.S., 2013. Hemorrhagic transformation: a review of the rate of hemorrhage in the major clinical trials of acute ischemic stroke. *Front Neurol* 4, 69.

- ❖ Suzuki, Y., Nagai, N., Umemura, K., 2016. A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci* 10, 2.
- ❖ Swanson, R.A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Savalos, R.A., Davidson, C., Sharp, F.R., 1990. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 10, 290–293.
- ❖ Tasan, R.O., Verma, D., Wood, J., Lach, G., Hörner, B., de Lima, T.C.M., Herzog, H., Sperk, G., 2016. The role of Neuropeptide Y in fear conditioning and extinction. *Neuropeptides* 55, 111–126.
- ❖ Taschner, C.-A., Treier, M., Schumacher, M., Berlis, A., Weber, J., Niesen, W., 2011. Mechanical thrombectomy with the Penumbra recanalization device in acute ischemic stroke. *J Neuroradiol* 38, 47–52.
- ❖ Teng, H., Zhang, Z.G., Wang, L., Zhang, R.L., Zhang, L., Morris, D., Gregg, S.R., Wu, Z., Jiang, A., Lu, M., Zlokovic, B.V., Chopp, M., 2008. Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 764–771.
- ❖ Threlfell, S., Sammut, S., Menniti, F.S., Schmidt, C.J., West, A.R., 2009. Inhibition of Phosphodiesterase 10A Increases the Responsiveness of Striatal Projection Neurons to Cortical Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 785–795.
- ❖ Threlfell, S., West, A.R., 2013. Review: Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signaling and phosphodiesterase inhibition. *Basal Ganglia* 3, 137–146.
- ❖ Tong, X., Hamel, E., 2000. Basal forebrain nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons project to microvessels and NOS neurons in the rat neocortex: Cellular basis for cortical blood flow regulation. *The European journal of neuroscience* 12, 2769–80.
- ❖ Touyz, R.M., Rios, F.J., Alves-Lopes, R., Neves, K.B., Camargo, L.L., Montezano, A.C., 2020a. Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Can J Cardiol* 36, 659–670.
- ❖ Touyz, R.M., Rios, F.J., Alves-Lopes, R., Neves, K.B., Camargo, L.L., Montezano, A.C., 2020b. Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Can J Cardiol* 36, 659–670.
- ❖ Tupal, S., Faingold, C., 2010. Inhibition of adenylyl cyclase in amygdala blocks the effect of audiogenic seizure kindling in genetically epilepsy-prone rats. *Neuropharmacology* 59, 107–111.
- ❖ Turner, R.C., DiPasquale, K., Logsdon, A.F., Tan, Z., Naser, Z.J., Huber, J.D., Rosen, C.L., Lucke-Wold, B.P., 2016. The role for infarct volume as a surrogate measure of functional outcome following ischemic stroke. *J Syst Integr Neurosci* 2.
- ❖ von Schroeder, H.P., Coutts, R.D., Lyden, P.D., Billings, E., Nickel, V.L., 1995. Gait parameters following stroke: a practical assessment. *J Rehabil Res Dev* 32, 25–31.
- ❖ Wadowski, P.P., Schörghofer, C., Rieder, T., Ertl, S., Pultar, J., Serles, W., Sycha, T., Mayer, F., Koppensteiner, R., Gremmel, T., Jilma, B., 2022. Microvascular rarefaction in patients with cerebrovascular events. *Microvasc Res* 140, 104300.
- ❖ Wahlestedt, C., Reis, D.J., 1993. Neuropeptide Y-related peptides and their receptors--are the receptors potential therapeutic drug targets? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33, 309–352.
- ❖ Wang, Q., Zhou, F.M., 2019. cAMP-producing chemogenetic and adenosine A2a receptor activation inhibits the inwardly rectifying potassium current in striatal projection neurons. *Neuropharmacology* 148, 229–243.
- ❖ Wei, X., Yan, R., Chen, Z., Weng, R., Liu, X., Gao, H., Xu, X., Kang, Z., Liu, Zhexing, Guo, Y., Liu, Zhenhua, Larsen, J.P., Wang, J., Tang, B., Hallett, M., Wang, Q., 2016. Combined Diffusion Tensor Imaging and Arterial Spin Labeling as Markers of Early Parkinson's disease. *Sci Rep* 6, 33762.

- ❖ Westphal, R.S., Tavalin, S.J., Lin, J.W., Alto, N.M., Fraser, I.D., Langeberg, L.K., Sheng, M., Scott, J.D., 1999. Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* 285, 93–96.
- ❖ Wickham, J., Ledri, M., Bengzon, J., Jespersen, B., Pinborg, L.H., Englund, E., Woldbye, D.P.D., Andersson, M., Kokaia, M., 2019. Inhibition of epileptiform activity by neuropeptide Y in brain tissue from drug-resistant temporal lobe epilepsy patients. *Sci Rep* 9, 19393.
- ❖ Widdowson, P.S., 1993. Quantitative receptor autoradiography demonstrates a differential distribution of neuropeptide-Y Y1 and Y2 receptor subtypes in human and rat brain. *Brain Res* 631, 27–38.
- ❖ Winter, B., Juckel, G., Viktorov, I., Katchanov, J., Gietz, A., Sohr, R., Balkaya, M., Hörtnagl, H., Endres, M., 2005. Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice. *Biol Psychiatry* 57, 1166–1175.
- ❖ Woldbye, D.P.D., Angehagen, M., Gøtzsche, C.R., Elbrønd-Bek, H., Sørensen, A.T., Christiansen, S.H., Olesen, M.V., Nikitidou, L., Hansen, T.V.O., Kanter-Schlifke, I., Kokaia, M., 2010. Adeno-associated viral vector-induced overexpression of neuropeptide Y Y2 receptors in the hippocampus suppresses seizures. *Brain* 133, 2778–2788.
- ❖ World Health Organization, 2004. The atlas of heart disease and stroke. World Health Organization.
- ❖ Xapelli, S., Silva, A.P., Ferreira, R., Malva, J.O., 2007. Neuropeptide Y can rescue neurons from cell death following the application of an excitotoxic insult with kainate in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Peptides* 28, 288–294.
- ❖ Yang, Y., Lv, J., Jiang, S., Ma, Z., Wang, D., Hu, W., Deng, C., Fan, C., Di, S., Sun, Y., Yi, W., 2016. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis* 7, e2234.
- ❖ Yang, Yi, Thompson, J.F., Taheri, S., Salayandia, V.M., McAvoy, T.A., Hill, J.W., Yang, Yirong, Estrada, E.Y., Rosenberg, G.A., 2013. Early Inhibition of MMP Activity in Ischemic Rat Brain Promotes Expression of Tight Junction Proteins and Angiogenesis During Recovery. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1104–1114.
- ❖ Yao, X., Smith, A.J., Jin, B.-J., Zador, Z., Manley, G.T., Verkman, A.S., 2015. Aquaporin-4 regulates the velocity and frequency of cortical spreading depression in mice. *Glia* 63, 1860–1869.
- ❖ You, J., Edvinsson, L., Bryan, R.M., 2001. Neuropeptide Y-mediated constriction and dilation in rat middle cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 77–84.
- ❖ Zandt, B.-J., ten Haken, B., van Putten, M.J.A.M., 2013. Diffusing substances during spreading depolarization: analytical expressions for propagation speed, triggering, and concentration time courses. *J Neurosci* 33, 5915–5923.
- ❖ Zeller, J.A., Lenz, A., Eschenfelder, C.C., Zunker, P., Deuschl, G., 2005. Platelet-leukocyte interaction and platelet activation in acute stroke with and without preceding infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1519–1523.
- ❖ Zhang, J., Yang, J., Zhang, C., Jiang, X., Zhou, H., Liu, M., 2012. Calcium antagonists for acute ischemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* CD001928.
- ❖ Zhang, L., Zhao, H., Zhang, X., Chen, L., Zhao, X., Bai, X., Zhang, J., 2013. Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat. *Brain Res Bull* 96, 45–53.
- ❖ Zudaire, E., Gambardella, L., Kurcz, C., Vermeren, S., 2011. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS One* 6, e27385.
- ❖ Zukowska-Grojec, Z., Karwatowska-Prokopczuk, E., Rose, W., Rone, J., Movafagh, S., Ji, H., Yeh, Y., Chen, W.T., Kleinman, H.K., Grouzmann, E., Grant, D.S., 1998. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res* 83, 187–195.