

lek. Agnieszka Segiet-Święcicka

**Rola TNF w ośrodkowej regulacji układu krążenia w warunkach
normo- i hipertensji**

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

Promotor: dr hab. n. med. i n. o zdr. Tymoteusz Żera

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2021

06.07.2021 Tymoteusz Żera
Agnieszka Segiet-Święcicka

Streszczenie

Wstęp: Nadciśnienie tętnicze jest kluczowym czynnikiem ryzyka wystąpienia zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych, jednak pomimo wielu lat prowadzenia badań, etiopatogeneza nadciśnienia tętniczego pierwotnego nie została w pełni poznana. U pacjentów hipertensyjnych, zwłaszcza opornych na standardową farmakoterapię, obserwowana jest komponenta neurogenna nadciśnienia, ze wzrostem aktywności współczulnej części autonomicznego układu nerwowego oraz zaburzonym działaniem odruchów sercowo-naczyniowych, w tym obniżoną czułością odruchu z baroreceptorów tętnicznych i zwiększoną aktywnością odruchu z chemoreceptorów obwodowych. Modelem eksperymentalnym nadciśnienia tętniczego neurogennego są szczury SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem. Postuluje się rolę cytokin prozapalnych, w tym TNF (*tumour necrosis factor*), w etiopatogenezie nadciśnienia tętniczego neurogennego. W proponowanym mechanizmie TNF poprzez działanie na obszary krążeniowe ośrodkowego układu nerwowego powoduje zmiany ich aktywności, co skutkuje zaburzeniami nerwowej regulacji ciśnienia tętniczego. Objawiają się one zmianą działania odruchów sercowo-naczyniowych i wzrostem aktywności współczulnej, a w efekcie prowadzą do podwyższenia wartości ciśnienia tętniczego i rozwoju nadciśnienia tętniczego. Obserwacje z przeprowadzonych dotychczas badań wskazują na udział TNF w nerwowej regulacji ciśnienia tętniczego, natomiast jego rola w patofizjologii nadciśnienia pierwotnego nie została jeszcze dostatecznie poznana.

Cel: Celem pracy było zbadanie roli cytokiny prozapalnej TNF w regulacji ciśnienia tętniczego w warunkach normo- i hipertensji w eksperymentalnym modelu nadciśnienia tętniczego pierwotnego u szczurów SHR z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem. Uzyskano to poprzez ocenę u szczurów normo- i hipertensyjnych: (1) czułości odruchów z baroreceptorów tętnicznych i chemoreceptorów obwodowych; (2) stężenia noradrenaliny w osoczu; (3) wpływu podania TNF do układu komorowego mózgu na ciśnienie tętnicze; (4) ekspresji TNF i (5) jego receptora typu 1 (TNFR1) w obszarach pnia mózgu i podwzgórza zawierających kluczowe ośrodki krążeniowe mózgowia (NTS, RVLM, PVN); (6) stężenia TNF i TNFR1 we krwi obwodowej; (7) występowania receptora TNFR1 na komórkach pnia mózgu.

Material i metody: Badanie przeprowadzono zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do

celów naukowych, po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w Warszawie (Uchwała nr 41/2015). Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych samcach szczurów Spontaneously Hypertensive Rat (SHR, szczury hipertensyjne) i Wistar-Kyoto (WKY, kontrolne szczury normotensyjne). Do badania włączano szczury w wieku 16 tygodni, co odpowiada u szczurów SHR okresowi rozwiniętego nadciśnienia tętniczego. Doświadczenia przeprowadzono na $n = 38$ szczurach SHR i $n = 38$ szczurach WKY. W części hemodynamicznej badania u zwierząt wszczepiano cewniki naczyniowe i kaniulę do komory bocznej mózgu w celu rejestracji średniego ciśnienia tętniczego (MABP) i częstości akcji serca (HR) oraz podawania badanych substancji. Oceniano wpływ TNF podawanego do układu komorowego mózgu na MABP w 120-minutowej obserwacji oraz farmakologicznie oceniano czułość odruchów z baroreceptorów tętniczych ($\Delta HR/\Delta MABP$) i chemoreceptorów obwodowych ($\Delta MABP$) po podaniu odpowiednio fenylefryny i cyjanku potasu. W celu oceny wpływu infuzji TNF do układu komorowego mózgu na MABP zwierzęta podzielono na cztery grupy doświadczalne: (1) grupa SHR-TNF: szczury SHR, dokomorowo podawany roztwór TNF w PBS, (2) grupa SHR-kontrola: szczury SHR, dokomorowo podawany PBS, (3) grupa WKY-TNF: szczury WKY, dokomorowo podawany roztwór TNF w PBS, (4) grupa WKY-kontrola: szczury WKY, dokomorowo podawany PBS. Po przeprowadzeniu pomiarów zwierzęta były poddawane eutanazji. Od dodatkowej grupy $n = 2$ szczurów SHR i $n = 2$ szczurów WKY pobrano mózgowia i przeprowadzono jakościową ocenę występowania TNFR1 na neuronach, mikrogleju i astrocytach w obrębie pnia mózgu z wykorzystaniem barwień immunofluorescencyjnych z użyciem pierwszorzędowych przeciwciał przeciw TNFR1 oraz beta-tubulinie, CD11b i GFAP, a następnie obrazowania w mikroskopii konfokalnej. W kolejnym etapie badania od osobnej grupy $n = 18$ szczurów SHR i $n = 18$ szczurów WKY pobrano krew i mózgowia i przeprowadzono oznaczenia biochemiczne i molekularne. Wykonano ilościowe oznaczenia ekspresji białka TNF oraz białka i mRNA TNFR1 w częściach grzbietowej i brzusznej rdzenia przedłużonego oraz podwzgórzu zawierających odpowiednio NTS, RVLM i PVN, oznaczenie stężeń TNF i TNFR1 w surowicy oraz stężenia noradrenaliny w osoczu krwi obwodowej. Do oznaczeń ekspresji białka TNF, TNFR1 i noradrenaliny wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA, do oznaczenia ekspresji mRNA TNFR1 wykorzystano metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR). U wszystkich

zwierząt przed pobraniem tkanek mierzono nieinwazyjnie ciśnienie tętnicze metodą wolumetryczną na tętnicy ogonowej.

Wyniki: W porównaniu ze szczurami WKY, u szczurów SHR obserwowano istotnie obniżoną czułość odruchu z baroreceptorów tętniczych i istotnie zwiększoną czułość odruchu z chemoreceptorów obwodowych. Natomiast stężenie noradrenaliny w osoczu krwi obwodowej było podobne pomiędzy szczurami SHR i WKY. Infuzja TNF do układu komorowego mózgu skutkowała wzrostem lub stabilizacją MABP względem obserwowanego w grupach kontrolnych malejącego trendu MABP, a presyjny efekt TNF podanego dokomorowo był znacznie silniej wyrażony u szczurów hipertensyjnych SHR niż w grupie szczurów normotensyjnych WKY. W barwieniach immunofluorescencyjnych wykazano obecność TNFR1 w obszarach rdzenia przedłużonego odpowiadających lokalizacji NTS i RVLM oraz stwierdzono ekspresję TNFR1 w neuronach, astrocytach i mikrogleju pnia mózgu szczurów SHR i WKY. Ekspresja białka TNF w części brzusznej i grzbietowej rdzenia przedłużonego oraz ekspresja białka TNFR1 w części grzbietowej rdzenia przedłużonego była istotnie wyższa u szczurów SHR niż WKY, podczas gdy ekspresja tych białek w podwzgórzu nie różniła się istotnie pomiędzy zwierzętami hiper- i normotensyjnymi. Jednocześnie ekspresja białek TNF i TNFR1 w ośrodkach krążeniowych mózgowia szczurów SHR i WKY była znacznie wyższa niż ich stężenie w surowicy krwi obwodowej. Ekspresja białka TNF w rdzeniu przedłużonym szczurów SHR i WKY była istotnie wyższa niż w podwzgórzu. Nie obserwowano istotnych różnic w ekspresji mRNA TNFR1 w ośrodkach krążeniowych mózgowia pomiędzy szczurami hiper- i normotensyjnymi.

Wnioski:

1. Nadciśnieniu tętniczemu u dorosłych szczurów hipertensyjnych SHR towarzyszy zmieniona regulacja odruchowa ciśnienia tętniczego objawiająca się obniżeniem czułości odruchu z baroreceptorów tętniczych i zwiększeniem czułości odruchu z chemoreceptorów obwodowych względem kontrolnych szczurów normotensyjnych WKY, co potwierdza neurogeną składową nadciśnienia u szczurów SHR.
2. Pomimo zmienionej regulacji odruchowej ciśnienia tętniczego u szczurów SHR z nadciśnieniem tętniczym, stężenie noradrenaliny w osoczu krwi obwodowej nie różni się istotnie pomiędzy szczurami SHR i WKY w warunkach spoczynkowych.

3. Zwiększona dostępność TNF w mózgowiu uzyskana poprzez podanie TNF do układu komorowego mózgu wywołuje wzrost ciśnienia tętniczego, a efekt presyjny TNF jest silniej wyrażony u szczurów hipertensyjnych SHR niż normotensyjnych WKY, co wskazuje na udział tej cytokiny w patogenezie nadciśnienia w badanym modelu nadciśnienia tętniczego.
4. TNF w mózgowiu może działać poprzez receptor typu I (TNFR1), którego obecność wykazano w neuronach, komórkach mikrogleju i astrocytach pnia mózgu szczurów SHR i WKY.
5. U szczurów SHR z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym obecna jest zwiększona ekspresja TNF w obszarach krążeniowych rdzenia przedłużonego. Szczury SHR mają istotnie wyższą ekspresję białka TNF w obszarach brzuszny i grzbietowy rdzenia przedłużonego, zawierających odpowiednio RVLM i NTS, niż szczury WKY. Natomiast ekspresja białka TNF w obszarze podwzgórza, zawierającego PVN, nie różni się istotnie pomiędzy szczurami SHR i WKY.
6. Nadciśnieniu tętniczemu w modelu szczura SHR towarzyszy zmieniona ekspresja białka receptora TNFR1 w obszarach krążeniowych rdzenia przedłużonego. Szczury SHR mają istotnie wyższą ekspresję białka TNFR1 w obszarze grzbietowym rdzenia przedłużonego, zawierającym NTS, niż szczury WKY. Ekspresja białka TNFR1 w obszarze podwzgórza, zawierającego PVN, oraz w brzusznej części rdzenia przedłużonego, zawierającej RVLM, nie różni się istotnie pomiędzy szczurami SHR i WKY. Jednocześnie ekspresja mRNA TNFR1 nie różni się istotnie pomiędzy szczurami SHR i WKY w obrębie części brzusznej i grzbietowej rdzenia przedłużonego oraz obszarze podwzgórza, co może sugerować różnice w efektywności translacji mRNA na białko lub szybkości degradacji białka TNFR1 pomiędzy szczurami hiper- i normotensyjnymi.
7. Stężenie białek TNF i TNFR1 w surowicy krwi obwodowej szczurów SHR i WKY jest znacznie niższe niż ich ekspresja w ośrodkach krążeniowych mózgowia, co wskazuje na miejscową syntezę TNF i jego receptora typu I w ośrodkowym układzie nerwowym.

Podsumowanie: Uzyskane wyniki pokazują, że w modelu nadciśnienia tętniczego pierwotnego szczurów SHR fenotypowi hipertensyjnemu towarzyszy zwiększona ekspresja TNF i jego receptora typu I w obszarach rdzenia przedłużonego obejmujących kluczowe ośrodki krążeniowe mózgowia, a infuzja TNF do układu komorowego mózgu skutkuje u szczurów hipertensyjnych

silniejszą odpowiedzią presyjną niż u kontrolnych szczurów normotensyjnych. Stwierdzono też obecność receptora TNF typu I w neuronach, astrocytach i mikrogleju rdzenia przedłużonego szczurów hiper- i normotensyjnych. Wyniki te wskazują na udział TNF w patogenezie nadciśnienia tętniczego poprzez możliwość oddziaływania TNF na ośrodki krążeniowe mózgowia, szczególnie u szczurów z fenotypem nadciśnieniowym i zaburzoną regulacją nerwową ciśnienia tętniczego.