

**mgr Dawid Gawliński**

Zakład Farmakologii Uzależnień

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: **prof. dr hab. Małgorzata Filip**

Promotor pomocniczy: **dr Małgorzata Frankowska**

Tytuł pracy doktorskiej:

***Wpływ zmodyfikowanej diety matki w czasie ciąży i laktacji na fenotyp potomstwa i ryzyko uzależnienia od kokainy - potencjalna rola receptorów melanokortynowych typu 4 w mózgu u szczurów***

## **STRESZCZENIE**

Badania translacyjne ostatnich lat dowodzą, że dieta spożywana w wieku młodocianym i dojrzałym ma duży wpływ na rozwój chorób mózgu, w tym uzależnień od substancji psychoaktywnych. Według koncepcji „rozwojowego pochodzenia zdrowia i choroby” (ang. *The Developmental Origins of Health and Disease*, DOHaD) również dieta matki w okresie płodowym, jak i wczesnym poporodowym wpływa na rozwój fizyczny i umysłowy potomstwa oraz może predysponować do wystąpienia wielu zaburzeń (np. otyłości, nasilonej impulsywności, depresji czy lęku), które inicjują rozwój zależności od substancji psychoaktywnych. Potwierdzeniem tego są dane przedkliniczne wskazujące, że odżywianie matki zmienia podatność młodocianych lub dorosłych zwierząt na alkohol, nikotynę oraz na smaczny, lecz niezdrowy pokarm. Wciąż brakuje jednak danych dotyczących zależności między składem diety matki, a rozwojem u potomstwa uzależnienia od kokainy (jednego z najczęściej stosowanych globalnie narkotyków wśród substancji o działaniu psychostymulującym). Ponieważ układ melanokortynowy mózgu działając poprzez receptory melanokortynowe typu 4 (MC-4) kontroluje – między innymi – zachowania żywieniowe, pamięć, wzmocnienie pozytywne i emocje, receptory te zostały wybrane jako potencjalny molekularny biomarker mechanizmów leżących u podłoża fenotypu podatnego na kokainę u młodocianego potomstwa szczurów wywołanego odżywianiem matki.

Przedmiotem niniejszej pracy było poszerzenie wiedzy na temat roli zmodyfikowanych rodzajów diety matki: diety wysokotłuszczowej (HFD), diety wysokowęglowodanowej, bogatej w sacharozę (HCD) oraz diety mieszanej (o zwiększonej zawartości tłuszczu i węglowodanów, MD) w okresie ciąży i laktacji na zmiany fenotypu szczurzego potomstwa obu płci z szczególnym uwzględnieniem predyspozycji do rozwoju uzależnienia od kokainy. W związku z tym, w pierwszym etapie badań oceniono zarówno parametry metaboliczne w surowicy krwi, jak również zmiany neurochemiczne w obrębie receptorów MC-4 w korze przedczołowej, grzbietowym prążkowie, jądrze półleżącym przegrody, polu brzusznej nakrywki i podwzgórzu u potomstwa w okresie wczesnej dorosłości. Dodatkowo wykorzystując model dożylnego samopodawania kokainy przeprowadzono szczegółową charakterystykę zwierząt w fazie wejścia w nałóg, jego podtrzymywania, w okresie abstynencji oraz podczas nawrotów zachowań poszukiwawczych tej substancji uzależniającej. Wykazano, że ekspozycja na zmodyfikowaną dietę matki zaburzała prawidłową masę ciała, jak również skutkowała zmianami w stężeniu leptyny, greliny, cholesterolu całkowitego, lipoprotein o wysokiej gęstości oraz triglicerydów w surowicy krwi potomstwa (głównie płci męskiej). Co więcej, matczyzna HCD zwiększała ekspresję receptora MC-4 w jądrze półleżącym przegrody u potomstwa obu płci oraz w grzbietowym prążkowie wyłącznie u samic. Z kolei wysokotłuszczowe środowisko wczesnego rozwoju osobniczego skutkowało zmniejszeniem ilości receptorów MC-4 we frakcji synaptosomalnej kory przedczołowej, grzbietowego prążkowie i podwzgórza u samców. W badaniach behawioralnych nie wykazano wpływu zmodyfikowanej diety matki na nagradzające i motywacyjne właściwości kokainy (brak różnic w fazie wejścia w nałóg i jego podtrzymywania), a także na okres abstynencji. Matczyzna HCD zwiększała natomiast siłę nawrotu zachowań poszukiwawczych kokainy indukowanych bodźcem warunkowym, kojarzonym z samopodawaniem tej substancji oraz bodźcem bezwarunkowym u potomstwa obu płci po wcześniejszym samopodawaniu kokainy i dziesięciodniowym okresie abstynencji. Pozostałe diety (HFD i MD) również nasilały nawrót zachowań poszukiwawczych kokainy, ale wyłącznie u męskiego potomstwa trenowanego do jej samopodawania w protokole ze wzrastającymi dawkami kokainy (0,25-1 mg/kg/infuzję).

Dru ga część pracy dotyczyła oceny wpływu samopodawania kokainy na układ melanokortynowy (receptory MC-4) oraz próby farmakologicznego zahamowania nawrotu zachowań poszukiwawczych kokainy z wykorzystaniem antagonisty receptorów MC-4 (ML 00253764) u samców z grup CD i HCD. Dowiedziono, że samopodawanie kokainy znacząco zwiększa ilość receptorów MC-4 w korze przedczołowej, jądrze półleżącym

przegrody, grzbietowym prążkowiui oraz polu brzusznyu nakrywki u potomstwa z grupy kontrolnej (CD). Natomiast w grupie HCD obserwowano jedynie obniżoną ekspresję tych receptorów w jądrze półleżącym przegrody. Ponadto, analizy neurochemiczne wykazały, że po dziesięciu dniach abstinencji kokainowej u zwierząt kontrolnych poziom receptorów MC-4 powraca do poziomu podstawowego, w przeciwieństwie do szczurów HCD, u których utrzymuje się obniżona ekspresja tych receptorów w jądrze półleżącym przegrody, podczas gdy w ciele migdałowatym znacznie wzrasta ekspresja receptorów MC-4. Powyższe różnice neurochemiczne wynikające z ekspozycji na matczyną HCD mogą odpowiadać za zmiany w nawrotach zachowań poszukiwawczych kokainy u tych zwierząt. Potwierdzeniem roli receptorów MC-4 w neurochemicznym podłożu zachowań poszukiwawczych substancji psychoaktywnej są także analizy farmakologiczne, w których ML 00253764 zmniejszał odpowiedź zwierząt w nawrotach zachowań poszukiwawczych kokainy indukowanych reekspozycją na bodziec warunkowy lub wzbudzającą dawką kokainy. U szczurów CD antagonistu receptorów MC-4 wykazywał aktywność wyłącznie w najwyższych dawkach, w odróżnieniu do zwierząt HCD, u których istotny wpływ na zachowanie obserwowano w całym zakresie dawek (2,5-15 mg/kg).

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy podkreślają, że narażenie potomstwa w okresie intensywnego wzrostu (okres ciąży i laktacji) na nieodpowiednio zbilansowaną dietę matki (HFD, HCD lub MD) zaburza prawidłowy jego rozwój, predysponując w okresie wczesnej dorosłości do rozwoju chorób metabolicznych oraz zaburzeń prawidłowej funkcji ośrodkowego układu nerwowego. Dodatkowo matczyu HCD zmieniając między innymi układ melanokortynowy (receptory MC-4) zwiększa siłę nawrotu zachowań poszukiwawczych kokainy. Obwodowe podanie antagonisty receptorów MC-4 hamuje nawrót zachowań poszukiwawczych kokainy, podkreślając translacyjną użyteczność otrzymanych wyników oraz możliwość wykorzystania receptorów MC-4 jako nowego celu dla projektowania leków minimalizujących prawdopodobieństwo nawrotu uzależnienia od kokainy. Jednocześnie obserwowane różnice w fenotypie potomstwa obu płci potwierdza istotność prowadzenia badań przedklinicznych z wykorzystaniem samców i samic, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia różnic w patomechanizmach chorób zależnych od płci oraz promować medycynę spersonalizowaną.

## **ABSTRACT**

Translational studies in recent years have proved that diet in adolescence and adulthood has a significant impact on the development of brain diseases, including substance use disorders. According to the hypothesis of “Developmental Origins of Health and Disease” (DOHaD), maternal diet in the fetal as well as in the early postnatal period affects the physical and mental development of the offspring and may predispose them to the occurrence of many disorders (e.g. obesity, increased impulsiveness, depression or anxiety), which initiate the development of substance use disorder. Preclinical data confirm this by showing that maternal nutrition changes the susceptibility of adolescent or adult animals to alcohol, nicotine, and palatable but unhealthy food. However, there is still a lack of data on the relationship between the composition of the maternal diet and the development of cocaine use disorder (one of the most commonly used drug globally among psychostimulant substances). Because of the brain's melanocortin system, acting through melanocortin-4 (MC-4) receptors, controls – among other things – nutritional behavior, memory, positive enhancement and emotions, these receptors have been selected as a potential molecular biomarker of mechanisms underlying the cocaine susceptible phenotype in rat offspring induced by maternal nutrition.

The subject of this study was to broaden knowledge about the role of modified types of maternal diets: high-fat diet (HFD), high-carbohydrate diet, high in sucrose (HCD) and a mixed diet (rich in fat and carbohydrate, MD) during pregnancy and lactation for phenotype changes in rat offspring of both sexes with particular emphasis on the predisposition to developing cocaine addiction. Therefore, in the first stage of the study, both metabolic parameters in blood serum, as well as neurochemical changes within MC-4 receptors in the prefrontal cortex, dorsal striatum, nucleus accumbens, ventral tegmental area and hypothalamus in early adulthood were assessed.

In addition, using the intravenous cocaine self-administration model, detailed characterization of animals phenotype during initiation, maintenance and extinction of cocaine self-administration, as well as during reinstatement of cocaine-seeking behavior was carried out. It was shown that exposure to the modified maternal diet disturbed normal body weight, as well as resulted in changes in the concentration of leptin, ghrelin, total cholesterol, high-density lipoproteins and triglycerides in the blood serum of offspring (mainly male). Furthermore, maternal HCD increased MC-4 receptor expression in the nucleus accumbens in offspring of both sexes and in the dorsal striatum only in females. In turn,

the high-fat environment of early development resulted in a decrease in the number of MC-4 receptors in the synaptosomal fraction of the prefrontal cortex, dorsal striatum, and hypothalamus in males.

Behavioral studies showed no effect of the modified maternal diets on the rewarding and motivational properties of cocaine (no differences in the phase of initiating and maintaining addiction), and on the period of drug abstinence. On the other hand, maternal HCD increased the strength of reinstatement of cocaine-seeking behavior induced by a conditional stimulus associated with self-administration of this substance and an unconditional stimulus in offspring of both sexes after previous cocaine self-administration and a 10-day extinction period. Other diets (HFD and MD) also intensified the reinstatement of cocaine-seeking behavior, but only in male offspring trained for self-administration in a protocol with increasing doses of cocaine (0.25-1 mg/kg/infusion).

The second part of the study concerned the assessment of the impact of cocaine self-administration on the melanocortin system (MC-4 receptors) and a pharmacological attempt to inhibit the reinstatement of cocaine-seeking behavior using the MC-4 receptor antagonist (ML 00253764) in males from the CD and HCD groups. Cocaine self-administration has been shown to significantly increase the number of MC-4 receptors in the prefrontal cortex, nucleus accumbens, dorsal striatum and ventral tegmental area in control offspring (CD). In contrast, offspring exposed to the maternal HCD showed only reduced expression of these receptors in the nucleus accumbens. In addition, neurochemical analyses showed that after 10 days of cocaine abstinence in control animals, the level of MC-4 receptors returns to baseline, unlike HCD rats in which the expression of these receptors persists in the nucleus accumbens, while in the amygdala expression of MC-4 receptors increases significantly.

The above neurochemical differences resulting from maternal HCD exposure may be responsible for changes in the relapse of cocaine-seeking behavior in these animals. The role of MC-4 receptors in the neurochemical basis of drug-seeking behavior was also confirmed in pharmacological analyses in which ML 00253764 reduced the animal response in relapses of cocaine-seeking behavior induced by re-exposure to a conditional stimulus or cocaine itself. In CD rats, the MC-4 receptor antagonist was only active at the highest doses, in contrast to HCD animals in which a significant effect on behavior was observed over the entire dose range (2.5-15 mg/kg).

In summary, the results of the present study point out that the exposure of offspring to a modified maternal diet (HFD, HCD or MD) during intensive development

(pregnancy and lactation) disrupts rat's normal development, predisposing them in early adulthood to the development of metabolic diseases and brain disorders. In addition, maternal HCD by altering, among others, the melanocortin system (MC-4 receptors) increases the strength of relapse of cocaine-seeking behavior. Peripheral administration of the MC-4 receptor antagonist inhibits the reinstatement of cocaine-seeking behavior, highlighting the translational utility of the results obtained and the possibility of using MC-4 receptors as a new target for drug design minimizing the possibility for relapse of cocaine. At the same time, the observed differences in the phenotype of both sexes confirm the importance of conducting preclinical studies using males and females, which could contribute to a better understanding of the differences in the pathomechanisms of sex-related diseases and promote personalized medicine.