

# **Rola jądra niskowzgórzowego w regulacji funkcji komórek natural killer (NK) u szczurów**

Beata Grembecka

Wysokoczęstotliwa stymulacja jądra niskowzgórzowego (HFS-STN) jest terapią skutecznie znoszącą motoryczne objawy choroby Parkinsona (chP). Udowodniono, że w przebiegu chP jądro niskowzgórzowe (STN) wykazuje zmienioną aktywność neuronalną – nadaktywność. Obok dobrze zbadanego wpływu HFS-STN na sprawność ruchową pacjentów z chP, nadal mało poznany został udział STN oraz HFS-STN w regulacji funkcji pozamotorycznych. W następstwie stosowania HFS-STN pojawiają się dość szeroko opisywane w piśmiennictwie objawy wegetatywne oraz występują zmiany w zachowaniu się pacjentów. Zupełnie niezbadany pozostaje natomiast nadal wpływ STN oraz HFS-STN na funkcję układu odpornościowego, zwłaszcza na wrodzoną odpowiedź przeciwnowotworową. Jest to tym bardziej zaskakujące, że istnieją dane wskazujące na obniżone ryzyko zapadania na choroby nowotworowe u osób cierpiących na chP. Niniejsza praca podejmuje problem udziału STN oraz HFS-STN w regulacji przeciwnowotworowej funkcji komórek NK, zmian w ich liczbie, na tle pozostałych populacji limfocytów we krwi obwodowej i w śledzienie u szczurów zróżnicowanych pod względem aktywności lokomotorycznej w nowym otoczeniu. Ocenie poddano również obraz białokrwinkowy we krwi obwodowej i w śledzienie oraz stężenie cytokin pro-zapalnych: czynnika martwicy nowotworów typu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukiny 6 (IL-6) i kortykosteronu (KORT) w osoczu krwi obwodowej.

Badania przeprowadzono na 68 szczurach, samcach szczepu Wistar podzielonych na wysoko – (HR) i niskoaktywne (LR) ruchowo w teście nowości. Doświadczenia prowadzono w 3 blokach. W pierwszym, jednostronną HFS-STN (jednogodzinny przepływ prądu o parametrach stosowanych terapeutycznie) stosowano u szczurów hemiparkinsoidalnych. Model jednostronnej chP uzyskano poprzez mikroiniekcję roztworu 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) w odpowiedniej dawce, do części zbitej istoty czarnej (SNpc) w prawej półkuli. Grupę kontrolną stanowiły szczury poddane mikroiniekcji tej samej objętości rozpuszczalnika dla 6-OHDA do SNpc w prawej półkuli i stymulacji pozornej (SHAM VEH). W drugim doświadczeniu, procedurze HFS-STN poddano szczury zdrowe (grupa HFS), a grupą kontrolną były zwierzęta poddane stymulacji pozornej (SHAM). Trzeci blok doświadczenia tworzyły szczury hemiparkinsoidalne, niepoddane stymulacji (HEMIP), a grupą kontrolną zwierzęta z jednostronną iniekcją roztworu rozpuszczalnika dla 6-OHDA do SNpc w prawej

półkuli (VEH). We wszystkich blokach oceniano: aktywność cytotoksyczną komórek NK (ACNK) z użyciem standardowego testu z izotopem  $^{51}\text{Cr}$ ; odsetek i bezwzględną liczbę komórek NK, limfocytów B, T oraz subpopulacji  $\text{TCD4}^+$  i  $\text{TCD8}^+$  na podstawie cytometrii przepływowej oraz standardowych metod hematologicznych; bezwzględną liczbę leukocytów i ich populacji we krwi obwodowej i w śledzionie. Poziom aktywacji osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (HPA) mierzono stężeniem kortykosteronu (KORT) w osoczu krwi obwodowej metodą radioimmunologiczną. Funkcję limfocytów we krwi obwodowej monitorowano stężeniem cytokin pro-zapalnych: czynnika martwicy nowotworów alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), interferonu gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ) i interleukiny 6 (IL-6) (ELISA). Krew obwodową, śledziony i mózgi pobierano w godzinę po zakończeniu HFS-STN lub stymulacji pozornej i po trwającym 3 tygodnie okresie pooperacyjnej rekonwalescencji. Neurodegenerację SNpc oceniano poprzez detekcję komórek pozytywnie wybarwionych na obecność hydroksylazy tyrozynowej ( $\text{TH}^+$ ) a lokalizację elektrody stymulacyjnej na preparatach barwionych metodą Nissla.

W pracy wykazano, że HFS-STN podwyższyła istotnie poziom ACNK w śledzionie w obu grupach stymulowanych, w porównaniu do grupy HEMIP. Liczba i odsetek komórek NK ( $\text{CD161a}^+$ ) oraz odsetek limfocytów  $\text{TCD4}^+$  w śledzionie były istotnie wyższe w grupie HFS HEMIP w porównaniu do HEMIP. W obu grupach zwierząt z modelem chP (HFS HEMIP i HEMIP) obserwowano natomiast podwyższenie poziomu ACNK i liczby komórek NK we krwi obwodowej, istotne w stosunku do grup kontrolnych (SHAM VEH i VEH). Poziom ACNK we krwi obwodowej warunkowany był istotnym wpływem jednostronnego uszkodzenia SNpc. Nie stwierdzono jednak, istotnych różnic w poziomach ACNK we krwi obwodowej pomiędzy grupami doświadczalnymi (HFS HEMIP, HFS i HEMIP). HFS-STN podwyższyła również istotnie stężenie  $\text{TNF-}\alpha$  i KORT, a obniżyła poziom IL-6 w osoczu krwi obwodowej u zdrowych (grupa HFS) i hemiparkinsonoidalnych (grupa HFS HEMIP) zwierząt, istotnie w porównaniu do szczurów z odpowiednich grup kontrolnych (SHAM lub SHAM VEH). Poziom IL-6 u stymulowanych szczurów (HFS i HFS HEMIP) i niestymulowanych zwierząt hemiparkinsonoidalnych (HEMIP) nie różnił się natomiast istotnie. HFS-STN stosowana u zwierząt z modelem chP (grupa HFS HEMIP) wywołała leukopenię, limfopenię dotyczącą populacji limfocytów B i subpopulacji  $\text{TCD8}^+$  we krwi obwodowej oraz T i B w śledzionie. Stężenie  $\text{IFN-}\gamma$  w osoczu krwi obwodowej wzrosło po HFS-STN u szczurów HFS HEMIP. U zdrowych zwierząt poddanych HFS-STN, poziom  $\text{IFN-}\gamma$  obniżył się natomiast w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej. Różnokierunkowy efekt dotyczący poziomu  $\text{IFN-}\gamma$  w osoczu krwi obwodowej szczurów stymulowanych (grupa HFS i HFS

HEMIP) związany był najprawdopodobniej z przesunięciem funkcjonalnym limfocytów TCD4<sup>+</sup> w kierunku odpowiedzi typu Th1, które mogło wystąpić w grupie HFS HEMIP.

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że jednorazowa HFS-STN, zastosowana u szczurów z modelem jednostronnej chP, wywołuje efekt immunostymulacyjny, przejawiający się podwyższonym poziomem ACNK w śledzionie, wzrostem odsetka i liczby komórek NK (CD161a<sup>+</sup>) we krwi obwodowej i w śledzionie oraz subpopulacji limfocytów TCD4<sup>+</sup> w śledzionie. Zmianom tych parametrów towarzyszy wzrost stężenia cytokin pro-zapalnych IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ .

Obok efektu immunostymulacyjnego, HFS-STN stosowana u zwierząt z modelem chP wywołuje efekt immunosupresyjny, przejawiający się leukopenią, limfopenią obejmującą limfocyty B i TCD8<sup>+</sup> we krwi obwodowej oraz T i B w śledzionie, z jednoczesnym wzrostem stężenia KORT w osoczu krwi obwodowej. Ten immunosupresyjny efekt, w odróżnieniu od efektu immunostymulacyjnego, zależy od charakterystyki behawioralnej zwierząt.

Jądro niskowzgórzowe, a w szczególności stosowana terapeutycznie HFS-STN, obok łagodzenia objawów motorycznych chP, wywiera również obwodowy efekt immunomodulacyjny, obejmujący zarówno wrodzoną, jak i nabytą odpowiedź immunologiczną. Wydaje się, że efekt ten zależy nie tylko, z uwagi na model chP, od zmian w transmisji katecholaminergicznej, ale również od mechanizmów związanych z pobudzającym wpływem STN na ośrodkowe struktury neurowydzielnicze, w tym na sprzężenie między osią podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową i cytokinami.