

Aktywność behawioralna i immunologiczna w warunkach aktywacji receptorów glutaminianergicznych typu NMDA jądra przyśrodkowej przegrody (*medial septum*) i zmienności indywidualnej u szczurów

Magdalena Podlacha

Jądro przyśrodkowej przegrody jest zaangażowane w modulowanie nie tylko różnych form zachowań i generowanie sygnału, zależnego od percepcji zagrożeń środowiska, ale także w regulację funkcji układu odpornościowego i aktywności behawioralnej, związanej z procesami pamięciowymi, co potwierdziły badania przeprowadzone w naszym zespole (Podlacha i wsp., 2013). Pomimo, dużego zagęszczenia receptorów glutaminianergicznych typu NMDA w tym obszarze oraz faktu, że receptory te wykazują ekspresję nie tylko w OUN, ale także m.in. na komórkach układu odpornościowego, zagadnienie dotyczące ich roli w modulowaniu procesów pamięciowych oraz związanych z nimi obwodowych i ośrodkowych funkcji układu odpornościowego, zwłaszcza u zwierząt różniących się pod względem wrażliwości na stres, pozostaje mało poznane.

Cel pracy: Celem niniejszych badań było zweryfikowanie roli receptorów glutaminianergicznych typu NMDA jądra przyśrodkowej przegrody w regulacji procesów uczenia się i zapamiętywania, a także aktywności układu odpornościowego, towarzyszącej tym procesom, w tym ośrodkowej ekspresji interleukiny-6, związanej z procesami pamięciowymi w aktywowanych (ekspresja białka Fos) strukturach mózgowia u szczurów, zróżnicowanych pod względem podatności na stres, mierzonej poziomem spontanicznej aktywności lokomotorycznej w teście nowości (HR vs. LR).

Metodyka: Badania przeprowadzono na 79 szczurach szczepu Wistar, które poddano testowi nowości (2 godz.), różnicującemu je na wysoko (HR) oraz nisko (LR) aktywne ruchowo w nowym otoczeniu (aktometry Opto – Varimex Minor, Columbus). Wszystkie zwierzęta podzielono losowo na 6 grup: SAL-1 (HR: n=3, LR: n=3), SAL-2 (HR: n=5, LR: n=7), D-AP7-1 (HR: n=5, LR: n=5), D-AP7-2 (HR: n=8, LR: n=7), NMDA-1 (HR: n=5, LR: n=7), NMDA-2 (HR: n=7, LR: n=7), a następnie zostały one umieszczone w aktometrach, celem pomiaru wyjściowej aktywności lokomotorycznej (10 min), wyrażonej trzema rodzajami ruchów: horyzontalnymi, wertykalnymi i ambulatoryjnymi. Po 7 dniach od wyznaczenia wyjściowej aktywności lokomotorycznej, pobrana została przez punkcję dosercową krew, która posłużyła do oznaczenia bazalnego poziomu badanych parametrów układu odpornościowego. Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie w 3 grupach (SAL-2, D-AP7-2 i NMDA-2) testu podniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) w warunkach wyjściowych (5 min), w którym mierzono aktywność behawioralną: całkowity czas przejścia

z otwartych (potencjalnie niebezpiecznych) ramion labiryntu do zamkniętych (bezpiecznych) ramion labiryntu; latencję startu; czas spędzony w otwartych/zamkniętych ramionach i w centrum labiryntu; liczbę wejść do otwartych/zamkniętych ramion i do centrum labiryntu oraz liczbę epizodów wspinania się, czyszczenia ciała, mikiacji i defekacji, a także aktywność eksploracyjną i czas spędzony w miejscu. Tydzień po zakończeniu badań behawioralnych, wszystkim zwierzętom zaimplantowano kaniule iniekcyjne do jądra przysiódkowej przegrody. Po mikroiniekcji odpowiednio: antagonisty receptorów glutaminianergicznych typu NMDA (D-AP7) (0,1 µg/szczura, grupa D-AP7-1 i D-AP7-2), ligandu receptorów typu NMDA (0,25 µg/szczura, grupa NMDA-1 i NMDA-2) bądź soli fizjologicznej (grupa SAL-1 i SAL-2), przy użyciu pompy mikroinfuzyjnej (Legato 100 – Series Syringe Pump, Kd Scientific, Holliston, Massachusetts, Stany Zjednoczone), powtórzono we wszystkich grupach zwierząt pomiar aktywności lokomotorycznej (10 min) w aktometrach, a szczury z grupy D-AP-2, NMDA-2 i SAL-2 poddano testowi EPM w układzie test (5 min), a po upływie 60 minut re-test (5 min). Po zakończeniu pomiarów behawioralnych, od wszystkich zwierząt pobrano próbki krwi, wyizolowano śledziony i mózgowia. Każdorazowo oznaczano: stężenie cytokin IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-10 i kortykosteronu w osoczu krwi obwodowej; odsetek poszczególnych limfocytów (T, B, TCD4⁺, TCD8⁺) we krwi obwodowej i w śledzionie; procent apoptozy komórek jednojądrzastych we krwi obwodowej (PBMC); bezwzględną liczbę leukocytów i procentowy udział ich subpopulacji, w tym limfocytów, LGL oraz aktywność cytotoksyczną komórek NK we krwi obwodowej i w śledzionie. Po wykonaniu perfuzji i odwodnieniu mózgow szczerów, przeprowadzono weryfikację histologiczną lokalizacji zakończeń kaniul iniekcyjnych, ustaloną przez porównanie preparatów histologicznych, wybarwionych fioletem krezyłu według Nissla z odpowiednimi tablicami atlasu mózgu szczura (Paxinos i Watson, 2007). Pokrojone przy użyciu kriostatu skrawki mózgowia posłużyły również do zbadania kolokalizacji ekspresji białka Fos z wybraną cytokiną – interleukiną-6 w strukturach drogi przegrodowo – hipokampalnej oraz w jądrach podwzgórza i ciała migdałowatego.

Wyniki: Wykazana po raz pierwszy w niniejszej pracy w warunkach obciążenia stresem indukującym lęk/niepokój i/lub zmienności indywidualnej u szczurów swoistość (wzrost badanego parametru po podaniu agonisty i obniżenie na drodze iniekcji antagonisty) receptorów glutaminianergicznych typu NMDA jądra przysiódkowej przegrody dotyczy głównie latencji przejścia z obszarów o charakterze awersyjnym (ramiona otwarte labiryntu) do stref bezpiecznych (ramiona zamknięte labiryntu) i czasu przebywania w nich, aktywności eksploracyjnej, aktywności cytotoksycznej komórek NK, stanowiących pierwszą linię

obrony przeciwnowotworowej i przeciwwirusowej organizmu we krwi obwodowej, zmian immunomodulacyjnych w postaci nasilonej aktywacji pro-zapalnej (stężenie TNF- α) i przeciwzapalnej (stężenie IL-10) w osoczu krwi obwodowej, a także odsetka komórek wykazujących ekspresję IL-6 w aktywowanym (Fos⁺) zakręcie zębatym hipokampa.

Wnioski: Receptory glutaminianergiczne typu NMDA jądra przyśrodkowej przegrody wpływają na aktywność behawioralną związaną z procesami pamięciowymi w warunkach stresu, indukującego lęk/niepokój, a także na obwodowe i ośrodkowe (w tym stężenie cytokin) funkcje układu odpornościowego, odgrywającego kluczową rolę w przebiegu procesów poznawczych i pamięciowych. Opisana aktywność behawioralna i immunologiczna, towarzysząca procesom pamięciowym, pośredniczona przy udziale receptorów glutaminianergicznych typu NMDA jądra przyśrodkowej przegrody, jest modulowana w sposób zależny od indywidualnych różnic we wrażliwości na obciążenie stresem nowości (HR vs. LR).