

STRESZCZENIE

Stres chroniczny, doświadczany na różnych etapach życia, zarówno u ludzi jak i zwierząt laboratoryjnych, powoduje nieprawidłowości w działaniu osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA), prowadząc między innymi do zmian w uwalnianiu hormonów glikokortykoidowych przez korę nadnerczy. Jest to jednym z kluczowych czynników wpływających na rozwój wielu zaburzeń czynności ośrodkowego układu nerwowego, w tym związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem pierwszorzędowej kory ruchowej (ang. primary motor cortex, M1) czy układu mezo-kortykolimbicznego, który bierze swój początek w obszarze brzuszno-pola nakrywki (ang. ventral tegmental area, VTA). Pierwsza z tych struktur zaangażowana jest w kontrolę ruchów dowolnych oraz uczenie się nowych zachowań ruchowych. Dowiedziono, że długotrwały stres oraz jego model, wielokrotne podania kortykosteronu, powodują zaburzenia wykonania testów ruchowych u szczurów, w co zaangażowana jest aktywacja receptorów glikokortykoidowych GR (ang. glucocorticoid receptor) i mineralokortykoidowych MR (ang. mineralocorticoid receptor, receptor) w korze M1. Druga z wymienionych struktur, VTA, odgrywa ważną rolę zarówno w regulacji procesów motywacyjnych oraz zachowań związanych z dążeniem do nagrody, jak i w kontroli zachowań awersyjnych. Włókna neuronów VTA, w tym neuronów dopaminergicznych, unerwiają m.in. korę M1. VTA charakteryzuje się wysoką wrażliwością na stresory, a nieprawidłowości w działaniu tej struktury mogą prowadzić do rozwinięcia się zaburzeń takich jak uzależnienia czy depresja. W ich patogenezie u ludzi często wymienia się historię zaniedbań lub przemocy ze strony rodziców, doświadczonych w dzieciństwie (ang. early life stress, ELS), co potwierdzają eksperymenty z udziałem zwierząt laboratoryjnych, poddanych procedurom modelującym ELS, takim jak separacja od matki (ang. maternal separation, MS). ELS i MS zaburzają rozwój i prawidłowe funkcjonowanie układu mezo-kortykolimbicznego, prowadząc do zwiększenia podatności na związane z ich zmienionym działaniem zaburzenia, w okresie dojrzewania i dorosłości.

Wiedza dotycząca neuronalnych mechanizmów zaburzeń spowodowanych długotrwałym i powtarzalnym stresem, związanych z korą M1 oraz VTA, jest niekompletna. Chociaż na podstawie badań modeli zwierzęcych udowodniono jego wpływ na elektrofizjologię neuronów

tych struktur, brakuje danych na temat wpływu stresu na strukturę neuronów, a w tym budowę drzewka dendrytycznego oraz gęstość i morfologię kolców dendrytycznych.

Celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, było scharakteryzowanie wpływu powtarzalnych podań kortykosteronu, stanowiących model powtarzającego się, krótkotrwałego stresu, na morfologię neuronów piramidowych kory M1 szczura, a także sprawdzenie wpływu separacji od matki, zwierzęcego modelu ELS, na budowę neuronów VTA oraz ich reaktywność na stres w późniejszym życiu u samic szczurów.

Badania przeprowadzone na drodze realizacji tego celu wykonano w dwóch blokach eksperymentów, w ramach dwóch projektów badawczych. W pierwszym z nich samce szczurów w okresie dojrzewania poddano siedmiodniowym iniekcjom kortykosteronu. Drugi blok obejmował samice szczurów poddane procedurze MS w okresie 2-14 dnia życia postnatalnego przez 3 godziny dziennie. Szereg wykonanych eksperymentów umożliwił ocenę wpływu zastosowanych modeli odpowiednio na: strukturę drzewka dendrytycznego oraz gęstość i morfologię kolców dendrytycznych neuronów piramidowych warstwy 2/3 i 5 M1 lub neuronów różnych obszarów VTA (V, ang. ventral, brzuszny/ D, ang. dorsal, grzbietowy; L, ang. lateral, boczny/ M, ang. medial, przyśrodkowy), gdzie dodatkowo sprawdzono także gęstość synaps pobudzających, na podstawie ich markera, białka PSD-95. W tym celu wykorzystano barwienie metodą Golgiego-Coxa, wypełnianie pojedynczych neuronów w skrawkach *ex vivo* biocytyną, barwienia immunohistochemiczne oraz metody z zakresu mikroskopii i komputerowej analizy obrazu. Ponadto, część samic po MS poddano w dorosłości jednorazowemu stresowi unieruchomienia, aby oszacować zmiany w ekspresji c-Fos (genu wczesnej odpowiedzi komórkowej, będącego markerem aktywacji komórek) w VTA spowodowane MS. Przy pomocy odpowiednio testów ELISA oraz techniki Western blot, sprawdzono także czy MS wywołuje u samic szczurów długotrwałe zmiany w poziomie hormonów związanych z działaniem osi HPA, kortykosteronu i ACTH (ang. adrenocorticotropic hormone, kortykotropina) oraz receptorów GR i MR w VTA.

Analiza statystyczna danych z pierwszego bloku eksperymentów, dotyczącego M1, wykazała istotny wpływ wielokrotnych podań kortykosteronu na złożoność części apikalnej drzewka dendrytycznego oraz lokalny, zależny od rzędowości dendrytów wzrost gęstości kolców neuronów piramidowych warstwy 2/3 tego obszaru. Kortykosteron spowodował ponadto zwiększenie gęstości kolców cienkich (uznawanych za formę niedojrzałą) w części apikalnej

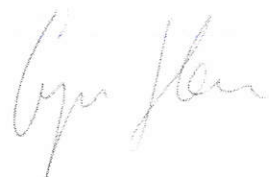
i bazalnej neuronów piramidowych warstwy 5 M1. Analiza danych pochodzących z drugiego bloku eksperymentów, dotyczącego VTA, wskazała na różnice pomiędzy częścią L i M struktury, u zwierząt niepoddanych stresowi separacji od matki widoczne między innymi w budowie neuronów dopaminergicznych (DA) zlokalizowanych w części VL i VM VTA - te pierwsze charakteryzowało większe i bardziej rozbudowane drzewko dendrytyczne. Zaobserwowane skutki MS były zależne od położenia w strukturze (V/D; L/M VTA) i charakteru neurochemicznego badanych neuronów (DA lub nieokreślone). W VL VTA były to drobne modyfikacje budowy drzewka dendrytycznego neuronów DA i zróżnicowane zmiany w średnicy główki kolców dendrytycznych (zależne od dokładnej lokalizacji i populacji neuronów); w części VM wzrostowi uległa liczba segmentów końcowych dendrytów neuronów DA oraz średnica główki kolców neuronów o nieznanym charakterze neurochemicznym. Dla całego V VTA charakterystyczny był spadek ogólnej liczby synaps pobudzających. W DL VTA zaobserwowano natomiast spadek gęstości kolców dendrytycznych oraz wzrost średnicy ich główki na dendrytach nieokreślonych neurochemicznie komórek, co miało miejsce także w części DM struktury, gdzie ponadto MS spowodowała wzrost reaktywności neuronów DA na stres doświadczony w dorosłości, mierzonej poziomem ekspresji c-Fos.

Otrzymane wyniki sugerują, że spowodowane siedmiodniowymi podaniami kortykosteronu modyfikacje strukturalne neuronów piramidowych warstwy 2/3 M1, mogą stanowić morfologiczny odpowiednik zmian elektrofizjologicznych obserwowanych pod wpływem podań tego hormonu, opisanych na podstawie równolegle przeprowadzonych doświadczeń. Zaobserwowane zmiany strukturalne mogą przyczyniać się do rozwoju zaburzeń ruchowych. Wywołany kortykosteronem wzrost gęstości cienkich kolców na neuronach piramidowych warstwy 5 M1, nie znajduje odzwierciedlenia w elektrofizjologii tych komórek. Może to świadczyć o tym, iż nowopowstałe cienkie kolce nie utworzyły funkcjonalnych połączeń synaptycznych. Jako hipotetyczny mechanizm zaobserwowanych zmian morfologicznych można zaproponować działanie kortykosteronu poprzez obecne w korze M1 receptory MR i/lub GR i wywołane w ten sposób zaburzenia w szlakach sygnalizacyjnych związanych z plastycznością strukturalną synaps i dendrytów. Niewykluczony jest także udział unerwienia dopaminergicznego M1, w dużej mierze pochodzącego z VTA.

Wyniki bloku eksperymentalnego dotyczącego VTA podkreślają heterogenność tej struktury i wskazują na konieczność rozpatrzenia różnorodnego wpływu MS na poszczególne

populacje neuronalne VTA, w kontekście różnic w tworzonych i otrzymywanych przez nie połączeniach, związanych z ich odrębnością funkcjonalną (np. różnicami we wrażliwości na stres czy zaangażowaniem w regulację zachowań nagradzających lub awersyjnych). Zaobserwowane skutki MS mogą powodować zmiany w funkcjonowaniu VTA i układu mezokortykolimbicznego i przyczyniać się do powstania związanych z tym nieprawidłowości, między innymi zwiększonej podatności na uzależnienia i zaburzenia depresyjne, częściej dotykające kobiety i zwierzęta płci żeńskiej w okresie dojrzewania i dorosłości, z historią trudnych doświadczeń okresu wczesnego rozwoju postnatalnego.

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej dostarczają nowej wiedzy na temat wpływu powtarzającego się stresu na morfologię neuronów piramidowych kory M1 oraz skutków ELS na strukturę różnych populacji neuronów VTA, a także zmian w ich reaktywności na stres w dorosłości. Wyniki te mogą się przyczynić do opracowania w przyszłości nowych, lepszych i dokładniej ukierunkowanych terapii zaburzeń, o genezie związanej z upośledzonym działaniem tych struktur spowodowanym długotrwałym i powtarzalnym stresem na różnych etapach rozwoju.


Anna Gąsior