

mgr Agnieszka Wawrzczak-Bargieła

Zakład Neurofarmakologii Molekularnej

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: **prof. dr hab. Ryszard Przewłocki**

Tytuł pracy doktorskiej:

Wpływ morfiny na aktywność kinaz ERK w wybranych strukturach mózgu myszy

Streszczenie

Opioidy powodują silne uzależnienie fizyczne i psychiczne, stąd też duże znaczenie ma poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podłoża zaburzenia ich używania. Substancje te inicjują przekazywanie sygnałów wewnątrz komórki i prowadzą do zmian w jej funkcjonowaniu. Szereg tych procesów zachodzi z udziałem kinaz zależnych od czynników zewnątrzkomórkowych (*Extracellular signal regulated kinases*, ERK). Kinazy ERK odgrywają znaczącą rolę w plastyczności synaptycznej i pamięci, oraz w mechanizmach powstawania uzależnień. Spośród kinaz ERK, kodowane przez dwa różne geny kinazy ERK1 i ERK2 i ich aktywne formy pERK1 i pERK2 wydają się pełnić szczególne, być może różne, role w ośrodkowym działaniu opioidów.

W niniejszej pracy analizowano zmiany fosforylacji kinaz ERK1 i ERK2 (poziomy pERK1 i pERK2) oraz całkowity poziom tych białek po podaniach morfiny u myszy, w strukturach mózgu zaangażowanych w powstawanie uzależnienia: prążkowiu, ciele migdałowatym, korze czołowej oraz hipokampie. Za pomocą metody Western blot wykazano, że jednorazowe podanie morfiny powoduje długotrwały wzrost fosforylacji kinaz ERK1 i ERK2 w prążkowiu, ciele migdałowatym oraz hipokampie. Natomiast nie stwierdzono aktywacji ERK1 i ERK2 w korze czołowej. Obserwowane zmiany w równym stopniu dotyczyły obydwu kinaz. Największe zmiany fosforylacji tych kinaz występowały w czasie od 2 do 4 h po podaniu morfiny. Wpływ morfiny na fosforylację ERK1 i ERK2 najsilniej zaznaczał się w hipokampie. Jednorazowe podanie morfiny nie wpływało na poziom całkowity białek ERK1 i ERK2.

Metodą immunohistochemii analizowano liczbę komórek pERK1/2 pozytywnych po jednorazowym podaniu morfiny w badanych strukturach mózgu. Analiza stereologiczna wykazała, że 4 h po jednorazowym podaniu morfiny dochodzi do wzrostu liczby komórek pERK1/2 pozytywnych, przede wszystkim w skorupie jądra półleżącego, jądrze podstawnym ciała migdałowatego oraz obszarze CA3 hipokampa. W hipokampie przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne w celu określenia fenotypu komórek pERK1/2 pozytywnych. Badanie wykazało, że do aktywacji kinaz pERK1/2 dochodzi w neuronach glutaminianergicznym.

Po przewlekłych podaniach wzrastających dawek morfiny, 4 h po ostatnim podaniu nie stwierdzono zmian fosforylacji ERK1 i ERK2 w prążkowiu, natomiast obserwowano spadek fosforylacji tych kinaz w ciele migdałowatym. Wzrost fosforylacji kinazy ERK2 (ale

nie ERK1) zaobserwowano w hipokampie, natomiast w korze czołowej dochodziło do wzrostu poziomu obu fosforylowanych kinaz. Stwierdzono również, że całkowity poziom białek ERK1 i ERK2 nie zmieniał się pod wpływem wielokrotnych podań morfiny.

Kolejne badania przeprowadzono w modelu wywołanej morfiną warunkowanej preferencji miejsca (*conditioned place preference*, CPP). Metodą Western blot stwierdzono obniżenie poziomu pERK1 i pERK2 w korze czołowej, hipokampie i ciele migdałowatym w fazie ekspresji CPP, natomiast w prążkowie obserwowano tendencję wzrostową. W strukturach mózgu, w których obserwowano spadek fosforylacji ERK1 i ERK2, całkowity poziom białka ERK1 ulegał obniżeniu, podczas gdy ilość białka ERK2 pozostawała na niezmiennym poziomie. W efekcie, stwierdzono, że w hipokampie, ciele migdałowatym i korze czołowej wzrastała ilość fosforylowanej formy ERK2 względem ERK1. Zaobserwowano, że czas przebywania myszy w pomieszczeniu kojarzonym z morfiną w teście warunkowanej preferencji miejsca silnie korelował ze spadkiem fosforylacji ERK1 i ERK2, jak również ze wzrostem stosunku pERK2/pERK1 w korze czołowej, ciele migdałowatym i hipokampie.

Analiza stereologiczna wykazała, że w jądrze środkowym ciała migdałowatego, obszarze CA3 hipokampa oraz w przyśrodkowej korze przedczołowej dochodziło do spadku liczby komórek pERK1/2 pozytywnych w czasie oczekiwania na nagrodę morfinową. Wzrost liczby komórek pERK1/2 pozytywnych obserwowano natomiast w grzbietowej części prążkowie. Szczegółowe badania immunofluorescencyjne wykazały, że w ciele migdałowatym kinazy pERK1/2 kolokalizują ze znacznikiem neuronów glutaminianergicznych zarówno w jądrze środkowym, jak i podstawnym, ale nie ze znacznikiem neuronów GABA-ergicznych.

Przeprowadzone badania wskazują, że poziom białek ERK1 i ERK2, jak również ich fosforylowanych form, ulega znacznym i wielokierunkowym zmianom pod wpływem morfiny w strukturach układu nagrody. Jednorazowe podanie opioidu aktywuje długotrwale obie kinazy, co prowadzi prawdopodobnie do zmian ekspresji genów i zależnych od nich białek, a w konsekwencji zapoczątkowuje bardziej trwałe zmiany na poziomie ekspresji genów późnych i struktury synaps. Przewlekłe podanie morfiny prowadzi do zróżnicowanych regulacji obu kinaz. W prążkowie zachodzi tolerancja, natomiast w korze czołowej obserwowana jest wzmożona aktywność ERK1 i ERK2. W hipokampie wzrasta fosforylacja ERK2, podczas gdy ERK1 nie ulega zmianom. Z kolei w ciele migdałowatym obserwuje się silne zahamowanie kinazy ERK2, oraz w mniejszym stopniu kinazy ERK1. Wydaje się więc, że w hipokampie i ciele migdałowatym pod wpływem przewlekłych podań morfiny istotną rolę pełni kinaza ERK2. Można założyć, że poziom badanych kinaz obrazuje zmiany zachodzące podczas procesów adaptacyjnych, które mogą leżeć u podstawy mechanizmów tolerancji i uzależnienia opioidowego. Natomiast w modelu warunkowanej preferencji miejsca wywołanej morfiną zaobserwowano złożoną regulację aktywności kinaz ERK1 i ERK2. W procesach kojarzenia sygnałów środowiskowych związanych z podawaniem leku i nabywania zachowania

poszukiwawczego dochodzi do zahamowania aktywności obu badanych kinaz oraz jednoczesnego spadku poziomu całkowitego poziomu białka ERK1, ale nie ERK2 w ciele migdałowatym, hipokampie i korze czołowej. Jednocześnie obserwowane zmiany fosforylacji w większym stopniu dotyczą pERK2 niż pERK1. Dodatkowo zmiany poziomu kinaz ERK1 i ERK2 silnie korelują z zachowaniem poszukiwawczym zwierząt warunkowanych morfiną w czasie ekspresji CPP. Wszystkie te badania wskazują, że kinaza ERK2 raczej niż ERK1 może mieć szczególne znaczenie w mechanizmach działania nagradzającego opioidów, a także powstawania uzależnienia. Wydaje się, że kinaza ERK2 może być potencjalnym celem postępowań terapeutycznych w leczeniu „zaburzenia wywołanego używaniem opioidów”.