

Streszczenie

Stres jest przyczyną zaburzeń funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Nieskuteczne strategie radzenia sobie z sytuacją stresową mogą prowadzić do chorób neuropsychiatrycznych, takich jak zespół stresu pourazowego (PTSD), depresja lub uzależnienia lekowe. Badania prowadzone na modelach zwierzęcych pomagają w zrozumieniu podstaw indywidualnych różnic w podatności oraz odporności na działanie stresu oraz mechanizmów leżących u podstaw tych chorób. Głównym celem rozprawy doktorskiej było poznanie neurobiologicznych mechanizmów, które leżą u podłoża odmiennych strategii radzenia sobie ze stresem u wybranych szczepów myszy.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem wsobnych szczepów myszy: C57BL/6J, SWR/J, DBA/2J oraz 129P3/J o zróżnicowanych fenotypach. Opracowano zwierzęcy model zaburzeń potraumatycznych, który obejmuje spektrum objawów PTSD (Szklarczyk i wsp., 2012). W celu określenia podatności na efekty silnego stresu, zastosowano bodziec w postaci ekspozycji na krótki intensywny szok elektryczny (1,5 mA przez 2 s) w klatkach do warunkowania strachu. Metoda ta pozwoliła na wywołanie narastających i utrzymujących się zaburzeń zachowania. Zbadano reakcję znieruchomienia w odpowiedzi na bodziec awersyjny (tzw. freezing), jak również długofalowe konsekwencje sytuacji stresowej, takie jak uwrażliwienie procesów pamięci zdarzenia traumatycznego, zwiększona pobudliwość, zaburzenia interakcji społecznych, zachowania przypominające depresję oraz skłonność do uzależnień. Trzy spośród badanych szczepów zostały scharakteryzowane jako podatne na rozwój negatywnych reakcji na sytuację stresową (C57BL/6J, DBA/2J i 129P3/J). Najsilniejsze zmiany stwierdzono u szczepu C57BL/6J, m.in. długotrwale utrzymujące się zaburzenia pamięci zdarzenia traumatycznego i narastający zgeneralizowany lęk. Szczep myszy SWR/J charakteryzował się największą odpornością na stres – reagował najniższym poziomem znieruchomienia w odpowiedzi na bodźce skojarzone z traumą i na nowe środowisko (Szklarczyk i wsp., 2012).

Dalsze badania prowadzono na dwóch szczepach o najbardziej odmiennych behawioralnych profilach odpowiedzi na stres: C57BL/6J i SWR/J. Zbadano, czy różnice w radzeniu sobie ze stresem będą utrzymywać się niezależnie od intensywności i rodzaju stresora. W tym celu, myszy C57BL/6J i SWR/J wystawiono na pięciokrotny szok elektryczny (5 x 1 mA przez 2 s, co 1 min) (Szklarczyk i wsp., 2015) lub na stres unieruchomienia (30 min)

(Szkłarczyk i wsp., 2016). Szczep C57BL/6J reagował znacznie silniejszym zneruchomieniem niż szczep SWR/J podczas ekspozycji na pięć następujących po sobie szoków elektrycznych oraz w klatce skojarzonej z bodźcem awersyjnym (Szkłarczyk i wsp., 2015). Stres unieruchomienia zwiększał różnice w warunkowaniu strachu oraz w zachowaniach lękowych i przypominających depresję między szczepami C57BL/6J i SWR/J (Szkłarczyk i wsp., 2016). U myszy C57BL/6J powodował silniejszą i dłużej utrzymującą się reakcję uwarunkowanego strachu oraz dłuższy bezruch w testach wymuszonego pływania i zawieszenia za ogon. Przeciwnie, u szczepu SWR/J wystawienie na stres unieruchomienia nie zwiększyło czasu bezruchu i skutkowało obniżeniem reakcji uwarunkowanego strachu. Ponadto, myszy SWR/J spędzały więcej czasu w centralnej części otwartego pola oraz dłużej wspinały się w teście wymuszonego pływania, co wskazuje na osłabienie zachowań lękowych i przypominających depresję. Podsumowując, pod wpływem silnego stresu, myszy C57BL/6J stały się bardziej pasywne (podniesione reakcje zneruchomienia i bezruchu), a myszy SWR/J - bardziej aktywne (obniżona reakcja zneruchomienia, wydłużony czas wspinania się i przebywania w eksponowanym miejscu).

Przy zastosowaniu techniki ilościowego PCR, zmierzone zostały poziomy ekspresji wybranych genów w odpowiedzi na bodziec awersyjny w obszarach mózgu związanych z kontrolą strachu oraz nabywaniem i odpamiętaniem warunkowych reakcji emocjonalnych (zespół jąder migdałowych i hipokamp) (Szkłarczyk i wsp. 2012, 2015). U szczepu SWR/J, stresor wywołał wzrost poziomu transkryptów genów kodujących białka prekursorowe peptydów opioidowych *Pdyn* i *Penk*. U myszy C57BL/6J, stwierdzono indukcję genów, których ekspresja jest zależna od aktywności receptora glukokortykoidowego (GR), m.in. *Tsc22d3*, *Crhr1* i *Nfkbia*. Badania te wskazały na potencjalne znaczenie aktywności systemów opioidowych oraz glukokortykoidów w kształtowaniu odpowiedzi behawioralnej na stres u szczepów C57BL/6J i SWR/J. Przy użyciu mikromacierzy DNA, porównano globalny poziom ekspresji w zespole jąder migdałowych myszy C57BL/6J i SWR/J w sytuacji stresowej (Szkłarczyk i wsp., 2016). Zidentyfikowano grupy współregulowanych genów, których ekspresja była związana z określoną reakcją na stresor. Wskazano też geny, które mogą łączyć się z aktywnym (m.in. *Homer1*, *Chordc*) oraz pasywnym (m.in. *Sgk1*, *Tsc22d3*, *Cdkn1a*, *Egr2*, *Dusp4*) stylem radzenia sobie ze stresem. Badania te wskazały, że jednym z głównych regulatorów ekspresji genów u myszy C57BL/6J charakteryzujących się pasywnym stylem radzenia jest GR.

Na podstawie różnic w ekspresji genów wskazujących na udział glukokortykoidów i endogennych opioidów w powstawaniu określonej strategii radzenia sobie ze stresem u myszy, do dalszych badań wybrano ligandy receptorów opioidowych i GR. W celu sprawdzenia wpływu wybranych substancji na nabywanie oraz pamięć traumatycznych zdarzeń, testy przeprowadzono w modelu warunkowania strachu na dwóch szczepach: C57BL/6J oraz SWR/J. Podanie morfiny, w dawce 20 mg/kg obniżało reakcję znieruchomienia u szczepu C57BL/6J (Szklarczyk i wsp., 2015, 2016). Podobne działanie stwierdzono po podaniu specyficznych agonistów receptorów κ : U-50488H w dawce 5 mg/kg oraz δ : BW373U86 w dawce 10 mg/kg (Szklarczyk i wsp., 2015). Z drugiej strony, podanie naltreksonu (2 mg/kg), nieselektywnego antagonisty receptorów opioidowych, u szczepu SWR/J przed bodźcem awersyjnym, nasiliło nabywanie i ekspresję uwarunkowanego strachu. Wyniki wskazują na związek pomiędzy silną aktywacją układu endogennych opioidów w sytuacji stresowej i rozwojem aktywnych strategii radzenia sobie ze stresem (Szklarczyk i wsp., 2015). Dodatkowe badania przeprowadzone z użyciem selektywnych antagonistów opioidowych (nor-BNI 10 mg/kg dla receptorów κ , naltrindol 5 mg/kg dla receptorów δ , cyprodime 2 mg/kg dla receptorów μ) wskazały na kluczową rolę receptorów δ w kontroli reakcji na stres (Szklarczyk i wsp., 2015).

W celu poznania roli glukokortykoidów w kształtowaniu pasywnych strategii radzenia sobie ze stresem, u myszy C57BL/6J zastosowano ligandy GR (deksametazon - syntetyczny glukokortykosteroid, w dawce 4 mg/kg; mifepriston - antagonist GR w dawce 20 mg/kg) w modelu warunkowania strachu (Szklarczyk et al., 2016). Podanie deksametazonu powodowało obniżenie reakcji znieruchomienia na uwarunkowany kontekst u myszy szczepu C57BL/6J, podobnie jak podanie morfiny. Działanie to było odwracane (nawrót reakcji strachu) przez zablokowanie receptorów opioidowych (naltrekson, 2 mg/kg) przed podaniem deksametazonu. Badania prowadzone na myszach szczepu SWR/J wykazały, że blokada receptorów opioidowych naltreksonem, przed stresem unieruchomienia, powodowała podniesienie poziomu kortykosteronu we krwi oraz aktywację transkrypcji genów zależnych od GR (*Fkbp5*, *Tsc22d3*) w zespole jąder migdałowatych. Wyniki tych oraz wcześniejszych badań (Szklarczyk i wsp., 2015) wskazują, że pasywny styl radzenia sobie ze stresem charakteryzuje obniżona aktywacja endogennych opioidów w sytuacji stresowej oraz nasilenie uwalniania glukokortykoidów.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły zidentyfikować i scharakteryzować dwa inbredowe mysie szczepy o odmiennych strategiach radzenia sobie z sytuacją stresową i wskazać potencjalne neurobiologiczne podstawy tych zachowań. Myszy C57BL/6J określone zostały jako model strategii pasywnych, które mogą prowadzić do zaburzeń potraumatycznych. Myszy SWR/J zostały scharakteryzowane jako model strategii aktywnych, które mogą chronić przed chorobami występującymi w następstwie silnego stresu. Wyniki badań wskazują, że interakcja systemów opioidowych i glukokortykoidów może kształtować indywidualne różnice w reagowaniu na sytuację stresową. Nasilona aktywność endogennego układu opioidowego wydaje się towarzyszyć kształtowaniu aktywnych strategii, a aktywacja systemu glukokortykoidowego - rozwojowi strategii pasywnych. Badania farmakologiczne wskazują, że GR oraz receptory opioidowe, w szczególności receptor δ , mogą stanowić potencjalne cele umożliwiające modyfikację strategii radzenia sobie ze stresem. Uzyskane wyniki istotnie poszerzają wiedzę z zakresu neurobiologicznych mechanizmów uczestniczących w kształtowaniu reakcji na bodźce awersyjne. Identyfikacja skutecznych stylów radzenia sobie i zrozumienie podstaw podatności lub odporności na negatywne konsekwencje sytuacji stresowych, może mieć istotne znaczenie w rozwoju przyszłej profilaktyki i interwencji w leczeniu zaburzeń będących konsekwencją stresu.

Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej:

1. Szklarczyk K., Korostynski M., Golda S., Piechota M., Ficek J., Przewlocki R. „Endogenous opioids regulate glucocorticoid-dependent stress-coping strategies in mice”, *Neuroscience* 2016, 330: 121-137. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.05.034. **IF=3,231, MNiSW: 25.**
2. Szklarczyk K., Korostynski M., Cieslak P., Wawrzczak-Bargiela A., Przewlocki R. “Opioid-dependent regulation of high and low fear responses in two inbred mouse strains”, *Behavioural Brain Research* 2015, 292: 95-101. doi: 10.1016/j.bbr.2015.06.001. **IF=3,002, MNiSW: 30.**
3. Szklarczyk K., Korostynski M., Golda S., Solecki W., Przewlocki R. “Genotype-dependent consequences of traumatic stress in four inbred mouse strains.”, *Genes Brain and Behavior* 2012; 11(8): 977–985. doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00850.x. **IF=3,275, MNiSW: 30.**