

**Charakterystyka myszy z selektywną ablacją
receptora glikokortykoidowego w neuronach
noradrenergicznych i ich reaktywność na stres**

Piotr Chmielarz

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Mózgu

Promotor: prof. dr hab. Irena Nalepa

Kraków 2014

Streszczenie

Zwierzęta transgeniczne są obecnie szeroko stosowane w badaniach nad molekularnymi podstawami zaburzeń psychiatrycznych. Zastosowanie systemów warunkowych nokautów genowych, takich jak system Cre/LoxP, umożliwia selektywne usunięcie genów w ściśle określonej populacji komórek. Pozwala to m.in. na badanie funkcji receptorów z nieosiągalną klasycznymi metodami selektywnością. Myszy transgeniczne są obecnie szeroko dostępne, jednak każda nowa linia zwierząt wymaga potwierdzenia zakładanej selektywności mutacji oraz scharakteryzowania jej ogólnych efektów, aby mogła zostać użyta w dalszych badaniach.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie linii myszy transgenicznych GR^{DBHCre} wykazujących selektywną ablację receptora glikokortykoidowego (GR) w komórkach noradrenergicznych i adrenergicznych ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń depresyjnych i reaktywności na stres.

Zwierzęta GR^{DBHCre} otrzymano przez skrzyżowanie myszy wykazujących ekspresję rekombinazy Cre pod kontrolą beta-hydroksylazy dopaminy, enzymu niezbędnego do syntezy noradrenaliny, ze zwierzętami posiadającymi sekwencję LoxP w genie GR. Dzięki temu usunięto GR z neuronów syntezujących noradrenalinę. Za pomocą barwień immunofluorescencyjnych i immunohistochemicznych potwierdzono selektywność mutacji i wykluczono jej wpływ na przeżywalność komórek noradrenergicznych w miejscu sinawym (LC). Nie wykazano również negatywnego wpływu mutacji na przyrost masy ciała oraz także sprawność ruchową i aktywność lokomotoryczną, mierzone w teście rota-rod oraz w teście otwartego pola. Następnie przebadano pamięć przestrzenną i roboczą, lękliwość oraz zachowania depresyjne odpowiednio w testach: zmodyfikowanego podniesionego labiryntu krzyżowego, labiryntu Y, jasnego-ciemnego pudełka oraz teście zawieszenia za ogon (TST). Wyniki testów pokazały że mutacja nie ma wpływu na zachowania samców, jednakże samice GR^{DBHCre} wykazują zaburzenia pamięci roboczej oraz zwiększoną lękliwość i wydłużenie czasu bezruchu (efekt „prodepresyjny”) w TST, wskazujące razem na depresyjny fenotyp samic. Również tylko u samic GR^{DBHCre} wykryto podwyższone wieczorne poziomy kortykosteronu w osoczu, podczas gdy poziomy poranne oraz indukowane ostrym stresem nie było zmienione, podobnie jak odpowiedź w teście hamowania deksamatezonem. Nie wykazano żadnych zmian w aktywności osi HPA u samców. U samic, ale nie samców, GR^{DBHCre} wykazano również nasilone spadki poziomów tkankowej noradrenaliny oraz zahamowanie wzrostów głównego metabolitu serotoniny kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w korze przedczołowej, po 30 minut od zakończenia 30 minutowego stresu unieruchomienia.

Wyniki te sugerują nadmierną aktywację układu noradrenergicznego oraz osłabioną aktywację układu serotonergicznego podczas epizodu stresu.

Ze względu na zależność od płci obserwowanych efektów mutacji, w dalszej części badań, zdecydowano się na eksplorację podłoża fenotypu depresyjnego u samic GR^{DBHCre} u zwierząt w stanie podstawowym. Wydłużenie czasu bezruchu w TST u samic GR^{DBHCre} udało się odwrócić zarówno podaniami dezypraminy (20 mg/kg) jak i fluoksetyny (10 mg/kg). W przypadku fluoksetyny wykryto istotny statystycznie wpływ genotypu na efekty leku, co przejawiało się znacznie większym obniżeniem czasu bezruchu u mutantów niż u zwierząt kontrolnych. Pozwala to spekulować o udziale komponenty serotoninowej w obserwowanym fenotypie depresyjnym. U samic GR^{DBHCre} wykryto również obniżenie poziomu mRNA receptora α_{1D} -adrenergicznego w korze przedczołowej oraz wzrost wiązania radioliganda do receptorów α_2 -adrenergicznych w LC. Poza tym wykryto wzrosty poziomu neurotrofiny BDNF w korze i hipokampie na poziomie mRNA. Zmiany te przekładały się w korze, ale nie w hipokampie, na wzrost poziomów białka BDNF oznaczonego metodą western blot. Nie wykryto natomiast różnic w gęstości kolców dendrytycznych wybarwionych metodą Golgiego-Cox'a między samicami kontrolnymi a mutantami.

Samce GR^{DBHCre} wykorzystano do badań nad rolą GR w układzie noradrenergicznym w odpowiedzi na 14 dniowy chroniczny stres unieruchomienia. Zarówno u samców GR^{DBHCre} jak i samców kontrolnych zaobserwowano podobne spadki masy ciała wywołane chronicznym stresem. Mutanty wykazały jednak oporność na behawioralne efekty stresu, gdyż nie przejawiały wzrostu lęklivości ani wydłużenia czasu bezruchu w TST, co zaobserwowano u chronicznie stresowanych zwierząt kontrolnych. Poza tym, w przeciwieństwie do samców kontrolnych, samce GR^{DBHCre} nie wykazały w wyniku chronicznego stresu zmian w poziomach mRNA neurotrofiny NTF3 i receptora TrkB. Niezależnie od genotypu chroniczny stres wywołał jednak podobne spadki w poziomie mRNA dla BDNF, w korze przedczołowej i hipokampie. U mutantów zaobserwowano również odmienny wpływ chronicznego stresu na poziom mRNA receptorów α_{1b} -, α_{2b} -, β_2 - i β_3 -adrenergicznych w korze przedczołowej oraz α_{2c} - i β_3 - w hipokampie.

Podsumowując wyniki prezentowane w niniejszej pracy pokazują że myszy GR^{DBHCre} mogą stać się interesującym modelem do badań zaburzeń depresyjnych i działania chronicznego stresu. Niniejsze badania wskazują na zależną od płci rolę GR w układzie noradrenergicznym w rozwoju zaburzeń depresyjnych i lęklivości, regulacji okołodobowej aktywności osi HPA oraz jego istotny udział w działaniu chronicznego stresu.