

**DOKTORANT:**        **Paulina Baran-Rachwalska**  
Zakład Fizjologii IF PAN  
Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie MOL-MED

**TEMAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:**

**Udział nerwu błędnego w regulacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza podczas stresu a ekspresja cyklooksyzgenazy (COX) i syntazy tlenu azotu (NOS)**

**PROMOTORZY:**

**dr hab. Anna Gądek-Michalska**

(Instytut Farmakologii PAN w Krakowie, Zakład Fizjologii)

**dr hab. Andrzej Bugajski**

(Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Katedra Patofizjologii)

**RECENZENCI:**

**prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim**

(Instytut Farmakologii PAN w Krakowie, Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej)

**prof. dr hab. Rafał Olszanecki**

(Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Katedra Farmakologii)

**STRESZCZENIE**

W odpowiedzi na stres bierze udział skoordynowany zespół reakcji, w wyniku których dochodzi do zmian adaptacyjnych zarówno na poziomie komórkowym jak i całego organizmu, przebiegających równocześnie i dotyczących wielu układów. Istotną rolę w procesach adaptacji i reakcji organizmu na sytuację stresową odgrywa oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (PPN), której aktywność podlega regulacji przez liczne systemy neuroprzekaźnikowe i związki modulujące, oddziałujące na ośrodkowy układ nerwowy. Badania wskazują, że tlenek azotu (NO) oraz prostaglandyny (PG) stanowią istotne mediatory zmian w mózgu, które powstają na skutek ekspozycji na bodźce stresowe, aczkolwiek dotychczasowe dane dotyczące ich roli w regulacji odpowiedzi stresowej często bywają sprzeczne. Modulujący wpływ na układ PPN ma także aktywność nerwu błędnego, który stanowi ważną dwukierunkową drogę komunikacji między ośrodkowym układem nerwowym a tkankami obwodowymi. Zmiany neurochemiczne i molekularne w mózgu wywołane pobudzeniem aferentnych włókien nerwu błędnego wpływają na aktywność neuroendokrynną komórek w podwzgórze. Zwiększona aktywność nerwu błędnego jest zazwyczaj wiązana z

hamowaniem czynności osi PPN, ale w niektórych przypadkach obserwowano także pobudzenie jej aktywności przez sygnały przekazywane przez włókna nerwu błędnego.

Celem badań było określenie roli dośrodkowej transmisji sygnału przez nerw błędny w regulacji aktywności osi PPN w warunkach stresu oraz ocena udziału prostaglandyn i tlenku azotu w tej regulacji poprzez zbadanie ekspresji enzymów ich syntezy (cyklooksygenazy konstytutywnej COX-1 i indukowalnej COX-2 oraz syntazy tlenku azotu neuronalnej nNOS i indukowalnej iNOS) w wybranych strukturach mózgu zaangażowanych w kontrolę czynności osi PPN.

W celu weryfikacji udziału nerwu błędnego w regulacji aktywności osi PPN oraz centralnych systemów neuroprzekaźnikowych, NOS/NO (zależnego od syntaz produkujących NO) i COX/PG (zależnego od cyklooksygenaz syntetyzujących PG), badania prowadzono na szczurach poddanych wagotomii podprzeponowej, a otrzymane wyniki porównywano z oznaczeniami przeprowadzonymi na szczurach kontrolnych z rzekomą wagotomią oraz szczurach kontrolnych nieoperowanych. Doświadczenia prowadzone były na samcach szczurów szczepu Wistar, które po ingerencji w ciągłość włókien nerwu błędnego i kilkudniowej rekonwalescencji pooperacyjnej zostały poddane ostrej i chronicznej ekspozycji na stres psychogeny. Wykorzystano dwa modele stresu doświadczalnego: krótkotrwały (10-minutowy) stres unieruchomienia, stosowany jednorazowo jako ostre pobudzenie układów reakcji stresowej, oraz chroniczny psychosocjalny stres przepełnienia (24 szczury w klatce przeznaczony na 6 osobników) przez 3, 7 lub 14 dni, stosowany oddzielnie albo łącznie ze stresem unieruchomienia w celu sprawdzenia wpływu chronicznej ekspozycji na stres na odpowiedź organizmu na ostre pobudzenie.

W badanych modelach stresu określono aktywność osi PPN poprzez oznaczenie poziomu hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) i kortykosteronu w osoczu metodą immunoenzymatyczną oraz zbadano poziomy ekspresji izoenzymów COX i NOS w podwzgórzu, korze przedczołowej i hipokampie metodą Western blot. Weryfikacji poprawnie przeprowadzonej wagotomii dokonano za pomocą histologicznego barwienia pobranych podczas operacji wycinków nerwu błędnego.

Ostry stres unieruchomienia wywołał krótkotrwałe pobudzenie osi PPN, wzrost ekspresji izoenzymów NOS w korze przedczołowej i hipokampie oraz nasilenie ekspresji izoenzymów COX w korze przedczołowej i podwzgórzu. Zmiany aktywności systemu NOS/NO w strukturach mózgowych układu limbicznego korelowały ze zmianami poziomu hormonów osi PPN i wskazują na udział NO w pobudzeniu i wyciszeniu reakcji stresowej. Pobudzenie systemu COX/PG nastąpiło po normalizacji aktywności osi PPN i układu NOS/NO, co sugeruje, że synteza PG w mózgu może być konsekwencją pobudzenia osi PPN i produkcji NO w strukturach mózgowych układu limbicznego w odpowiedzi na ostry stres unieruchomienia. Pomędzy badanymi grupami szczurów po wagotomii podprzeponowej i szczurów kontrolnych nie zaobserwowano różnic w zmianach badanych parametrów, co wskazuje na brak udziału nerwu błędnego w regulacji sekrecji hormonów osi PPN i aktywności systemów NOS/NO i COX/PG w odpowiedzi na ostry stres unieruchomienia.

Sygnaly z tkanek obwodowych przekazywane do mózgu przez włókna nerwu błędnego miały istotny udział w zmianach aktywności osi PPN i ekspresji izoenzymów NOS i COX wywołanych przez stres psychosocjalny. Ekspozycja na stres przepełnienia przez 3 dni wywołała hiperaktywność osi PPN wyłącznie u szczurów z zachowanym nerwem błędnym. Blokada hiperkortyzolemii przez podprzeponową wagotomię korelowała z zahamowaniem nasilenia ekspresji nNOS w korze przedczołowej. Uprzedni 3-dniowy psychosocjalny stres przepełnienia wywołał także desensytyzację odpowiedzi osi PPN na dodatkową ekspozycję na ostry stres unieruchomienia oraz zniósł wywołane unieruchomieniem pobudzenie aktywności systemu NOS/NO w korze przedczołowej. Efekt ten był obserwowany tylko u szczurów kontrolnych, co wskazuje, że osłabienie ostrej odpowiedzi osi PPN pod wpływem psychosocjalnego stresu przepełnienia, które jest związane z zahamowaniem pobudzenia syntezy NO w korze przedczołowej, może być konsekwencją hiperaktywności glikokortykoidowej i podlega regulacji przez nerw błędny. Niezależnie od ingerencji w ciągłość włókien nerwu błędnego 3-dniowy stres przepełnienia nasilił ekspresję nNOS w podwzgórzu oraz zahamował wywołany unieruchomieniem wzrost iNOS w hipokampie i COX-1 w korze przedczołowej.

Stwierdzono, że aktywność osi PPN ulega adaptacji w warunkach przedłużającego się stresu psychosocjalnego. Po 7 dniach stresu przepełnienia hiperaktywność osi PPN i jej desensytyzacja na ostry stres uległy normalizacji. Wyniki oznaczeń Western blot wykazały, że 7-dniowy stres przepełnienia wywołał reorganizację w systemach NOS/NO i COX/PG w strukturach mózgowych zaangażowanych w regulację odpowiedzi stresowej. Zanikła nadmierna ekspresja nNOS w podwzgórzu i korze przedczołowej, ale nasiliła się synteza COX-1 w podwzgórzu u szczurów z zachowanym nerwem błędnym. Normalizacja obniżonej odpowiedzi osi PPN na dodatkowy ostry stres może mieć związek z przywróceniem pobudzenia ekspresji nNOS w korze przedczołowej po ekspozycji na 10-minutowe unieruchomienie. U zwierząt po wagotomii podprzeponowej uprzedni 7-dniowy stres przepełnienia obniżył odpowiedź osi PPN na 10-minutowe unieruchomienie, co korelowało z zahamowaniem pobudzenia ekspresji iNOS i COX-2 w korze przedczołowej.

Po 14 dniach psychosocjalnego stresu przepełnienia obserwowano sensytyzację odpowiedzi osi PPN na ostry stres unieruchomienia niezależnie od ingerencji w ciągłość włókien nerwu błędnego. Zwiększona sekrecja hormonów osi korelowała ze zmianami aktywności badanych systemów neuroprzekaźników w mózgu. Ekspozycja na 14-dniowy stres przepełnienia wywołała chroniczne nasilenie ekspresji nNOS w podwzgórzu, korze przedczołowej i hipokampie u zwierząt z zachowanym nerwem błędnym, natomiast u szczurów po wagotomii podprzeponowej obserwowano chroniczną aktywację układu COX/PG w podwzgórzu. Sensytyzacja osi PPN może mieć również związek z aktywacją systemu NOS/NO w podwzgórzu w odpowiedzi na ostry stres unieruchomienia i/lub osłabieniem wywołanego unieruchomieniem pobudzenia systemu COX/PG w badanych strukturach mózgowych układu limbicznego.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że zakłócenie przepływu informacji z tkanek obwodowych do mózgu poprzez przecięcie aferentnych włókien nerwu błędnego istotnie wpływa na regulację odpowiedzi stresowej przez centralne systemy neuroprzekaźnikowe NOS/NO i COX/PG. Wykazano, że nerw błędny ma istotny udział w wywołanych przez stres psychosocjalny zmianach aktywności osi PPN i zmianach ekspresji izoenzymów NOS i COX w strukturach mózgowych zaangażowanych w regulację odpowiedzi stresowej.