

mgr Ewa Szczęsny

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„Udział insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1) w patomechanizmach stresu prenatalnego u szczurów”

Promotor: dr hab. A. Basta-Kaim, prof. IF PAN

Recenzenci: prof. G. Nowak (Instytut Farmakologii PAN w Krakowie)

prof. J. Kowalski (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach)

Wiele doniesień wskazuje na znaczącą rolę stresu prenatalnego w rozwoju zaburzeń psychicznych o charakterze afektywnym w życiu dorosłym. Etiologia tego rodzaju chorób nie została jak dotychczas wyjaśniona, zaś wśród prawdopodobnych przyczyn ich powstawania wymienia się ostatnio zmiany w funkcjonowaniu systemów związanych z czynnikami wzrostowymi, np. insulinopodobnym czynnikiem wzrostu-1 (IGF-1). Nieliczne dostępne dane doświadczalne pokazują, iż niedobór tego czynnika może prowadzić do wystąpienia objawów przypominających depresję, chroniczne podania leków przeciwdepresyjnych normalizują poziom IGF-1 w hipokampie, natomiast domózgowe podania IGF-1 wykazują działanie przeciwdepresyjne. W biologicznym efekcie IGF-1 w mózgu szczególne znaczenie ma prawidłowa regulacja jego działania w obrębie kory czołowej i hipokampa, a więc struktur których dysfunkcje wiąże się z podłożem niektórych objawów obserwowanych w depresji. Biorąc pod uwagę doniesienia o wzajemnych interakcjach pomiędzy cytokinami a IGF-1, sugeruje się równocześnie wpływ elementów odpowiedzi zapalnej na funkcjonowanie systemu IGF. Dlatego też przedmiotem badań było określenie czy stres prenatalny prowadzi do odległych w czasie zmian w poziomie IGF-1 oraz czynników regulujących ten system u dorosłych szczurów. Podjęto także próbę wyjaśnienia niektórych mechanizmów leżących u podstaw zaobserwowanych zmian.

Badania prowadzono w modelu stresu prenatalnego, który uważany jest za zwierzęcy model przypominający depresję. Ciężarne samice szczurów szczepu Sprague-Dawley poddawano stresowi unieruchomienia i oświetlenia trzy razy

dziennie przez 45 minut od 14 dnia ciąży. Eksperymenty prowadzono na dorosłych (3-miesięcznych) samcach szczurów – potomstwie matek stresowanych i niestresowanych.

Przeprowadzając weryfikację behawioralną, w teście wymuszonego pływania pokazano, że dorosłe zwierzęta stresowane prenatalnie mają istotnie wydłużony czas bezruchu i skrócony czas wspinania w porównaniu ze zwierzętami niestresowanymi. W teście podniesionego labiryntu krzyżowego zwierzęta stresowane rzadziej wchodziły do ramienia otwartego labiryntu oraz spędzały w nim mniej czasu niż zwierzęta kontrolne. Wyniki te świadczą o pro-depresyjnym i pro-łękowym działaniu stresu prenatalnego na dorosłe samce szczurów.

Po weryfikacji behawioralnej prowadzono badania biochemiczne metodami RT-PCR oraz Western blot i ELISA.

Stwierdzono, że w wybranych do badań strukturach ośrodkowego układu nerwowego – hipokampie i korze czołowej – stres prenatalny powoduje istotny statystycznie spadek ilości IGF-1 przy braku zmian w ekspresji IGF-1 mRNA. Nie wykazano natomiast wpływu stresu na poziom IGF-1 we krwi.

Ponieważ IGF-1 wywiera swoje działanie biologiczne poprzez receptor IGF-1R, oceniono ekspresję mRNA oraz gęstość podjednostek receptora u zwierząt kontrolnych i po stresie prenatalnym. Wykazano zmniejszenie ekspresji IGF-1R mRNA oraz obniżenie ilości podjednostek receptora - zewnątrzkomórkowych (α) i wewnątrzkomórkowych (β) w korze czołowej. Dodatkowo w obu badanych strukturach u zwierząt stresowanych prenatalnie pokazano obniżenie poziomu ufosforylowanej aktywnej formy podjednostki receptora IGF-1.

Aby ocenić, czy wykazane u zwierząt prenatalnie stresowanych zmiany behawioralne mogą być związane z obniżonym centralnym poziomem IGF-1, związek ten podano zwierzętom dokomorowo. Zaobserwowano iż podanie IGF-1 istotnie skróciło czas bezruchu i wydłużyło czas wspinania u zwierząt prenatalnie stresowanych w teście Porsolta. Natomiast podanie antagonisty receptora (związku JB1) 30 min przed IGF-1 znosiło ten efekt, co potwierdza udział receptora IGF-1 w jego działaniu w tym modelu. Jednym z istotnych czynników regulujących funkcję receptora IGF-1 jest białko IRS-1. U zwierząt po stresie prenatalnym poziom jego formy ufosforylowanej (p-IRS-1) w obu badanych strukturach mózgu był istotnie podwyższony, co może mieć wpływ na hamowanie jego funkcji.

W kolejnym etapie badań oznaczono poziom białek wiążących IGF (IGFBP), które transportują, regulują biodostępność oraz aktywność biologiczną IGF-1. Spośród sześciu badanych białek w hipokampie wykazano istotne obniżenie poziomu IGFBP-2, -3 i -5, a w korze czołowej - obniżenie IGFBP-2, -3 i -6. Jednocześnie w obu strukturach obserwowano zwiększenie ilości IGFBP-4.

Jedną z przyczyn występowania zaburzeń o charakterze depresyjnym jest patologiczna aktywacja zapalna układu odpornościowego, a równocześnie cytokiny mogą modulować działanie IGF-1. Dlatego też w kolejnym etapie badań dokonano analizy ekspresji mRNA i poziomu wybranych cytokin w strukturach mózgu u zwierząt po stresie prenatalnym. Ponadto, podając zwierzętom kontrolnym i stresowanym endotoksynę – LPS – oceniono wpływ stresu na odpowiedź immunologiczną zwierząt w warunkach dodatkowej aktywacji zapalnej.

Stwierdzono, że obwodowe podanie LPS w strukturach mózgu zwierząt niestresowanych i prenatalnie stresowanych obniża poziom IGF-1.

Określając działanie stresu prenatalnego na ekspresję cytokin wykazano wzrost mRNA dla IL-1 β , IL-10 i IFN- γ w hipokampie, zaś w korze czołowej dodatkowo jeszcze TNF- α . Podanie LPS zwierzętom kontrolnym spowodowało podniesienie ekspresji mRNA wszystkich badanych cytokin w hipokampie. W korze czołowej nie zaobserwowano zmian jedynie w mRNA dla IFN- γ . Po podaniu LPS zwierzętom prenatalnie stresowanym zaobserwowano istotnie niższy niż u zwierząt kontrolnych (niestresowanych) wzrost mRNA IL-1 β w obu strukturach, a w korze czołowej także TNF- α . Stwierdzono również wpływ procedury stresu prenatalnego na poziom cytokin. W hipokampie i korze czołowej u tych zwierząt zaobserwowano wzrost ilości IL-1 β , TNF- α oraz IFN- γ . LPS wywołał w mózgzach zwierząt kontrolnych podwyższenie poziomu IL-1 β , IL-6 i TNF- α , zaś u zwierząt prenatalnie stresowanych wzrost IL-1 β , a w hipokampie także TNF- α . Tym samym pokazano zmiany w ekspresji mRNA i poziomach cytokin pod wpływem stresu prenatalnego oraz zmienną zdolność komórek immunokompetentnych w mózgzach zwierząt po stresie do produkcji cytokin w warunkach dodatkowej stymulacji zapalnej.

Aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT-3 może być związana z działaniem cytokin i niektórych czynników wzrostowych. Aby określić, czy stres prenatalny oraz jednorazowe podanie LPS zmienia jego udział w regulacji procesów fizjologicznych oznaczono ekspresję mRNA oraz poziom STAT-3. Pokazano, że ekspresja STAT-3 mRNA nie uległa zmianie pod wpływem stresu prenatalnego w

żadnej z badanych struktur, natomiast podwyższa się w odpowiedzi na podanie LPS w mózgach zwierząt z obu badanych grup. Wzrost ilości białka STAT-3 zaobserwowano jedynie w korze czołowej zwierząt kontrolnych po podaniu LPS.

Ponieważ przedstawione powyżej wyniki wskazują na zmiany w ekspresji oraz poziomach cytokin w badanych grupach zwierząt, dlatego w kolejnych badaniach u zwierząt kontrolnych (niestresowanych) i po stresie prenatalnym oznaczono ekspresję mRNA oraz poziom wybranych białek SOCS-1, SOCS-2 oraz SOCS-3, które są wewnątrzkomórkowymi inhibitorami przekazu sygnału pochodzącego głównie od receptora cytokinowego. Ich ekspresja indukowana jest również przez endotoksyny i czynniki troficzne.

Stres prenatalny nie modulował ekspresji mRNA i poziomu SOCS-1 w badanych strukturach mózgu. Natomiast po podaniu endotoksyny obserwowano zróżnicowany wzrost ekspresji mRNA istotnie mniejszy w hipokampie zwierząt po stresie prenatalnym. W korze czołowej nie wykazano zmian w ekspresji mRNA i ilości SOCS-2. W hipokampie natomiast ekspresja SOCS-2 mRNA u zwierząt stresowanych uległa obniżeniu. Podanie endotoksyny jedynie w niewielkim stopniu modulowało ekspresję mRNA i poziom tego białka. Stres prenatalny nie wpływał na mózgową ekspresję mRNA dla SOCS-3. Jej wzrost pod wpływem podania LPS w hipokampie był zróżnicowany- istotnie niższy u zwierząt stresowanych. Podobne zależności obserwowano przy modulacji poziomu białka przez LPS.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały, że u zwierząt prenatalnie stresowanych pojawiają się zaburzenia zachowania przypominające zachowania depresyjne u ludzi. Jedną z przyczyn ich wystąpienia może być spadek ilości IGF-1 i zaburzenia jego funkcjonowania w przebadanych strukturach mózgu. Elementami mechanizmu odpowiedzialnego za nieprawidłowe działanie systemu związanego z IGF-1 szczurów stresowanych prenatalnie są: zmniejszenie gęstości i obniżenie funkcji receptora oraz wzrost fosforylacji IRS-1, a także zmiany ilości białek wiążących IGF. W stresie prenatalnym obserwuje się także zmiany poziomu cytokin oraz czynników regulujących ich działanie – SOCS-2, SOCS-3, które również można połączyć z upośledzeniem funkcji układu opartego o IGF-1.