

## **Układ opioidowy jądra konarowo-mostowego nakrywki hamuje hipokampalny rytm theta wywołany stymulacją farmakologiczną u szczurów**

*Emilia Leszkowicz, Paweł Matulewicz., Weronika Trojnar*

Katedra Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Gdańskiego

### **Streszczenie**

Jądro konarowo-mostowe nakrywki (PPN) jest jedną z kluczowych struktur w regulacji hipokampalnego rytmu theta. Wiadomo, że aktywacja układu cholinergicznego PPN indukuje rytm theta w hipokampie. W niniejszej pracy zajęto się zbadaniem wpływu układu opioidowego, który w PPN reprezentowany jest przez receptory  $\mu$ -opiodowe, na cholinergiczną składową rytmu theta na modelu szczurów uretanizowanych. W tym celu w trzech grupach zwierząt podawano do PPN: (1) agonistę cholinergicznego, karbachol (grupa KA); (2) KA łącznie z agonistą opiodowym, morfiną (grupa KA+MF); (3) KA łącznie z MF i antagonistą opiodowym, naloksonem (grupa KA+MF+NAL). Mierzono latencję i czas trwania rytmu theta wywołanego iniekcjami. Wpływ MF i NAL na indukowany cholinergicznym rytmem theta oceniano porównując mierzone parametry pomiędzy grupami. Okazało się, że MF obustronnie hamowała cholinergicznym indukowany rytm theta wydłużając jego latencję i skracając czas trwania. Latencja tego rytmu po stronie ipsilateralnej wynosiła  $1,8 \pm 0,7$  min w grupie KA i  $4,0 \pm 1,5$  min w grupie KA+MF ( $p \geq 0,05$  między grupami), a po stronie kontralateralnej odpowiednio  $2,0 \pm 0,8$  min i  $9,0 \pm 1,3$  min ( $p \leq 0,05$ ). Czas trwania aktywności theta wyniósł  $40,4 \pm 6,4$  min w grupie KA i  $18,6 \pm 6,1$  min w grupie KA+MF ( $p \leq 0,05$ ) w hipokampie ipsi- i odpowiednio  $41,1 \pm 7,3$  min i  $15,0 \pm 6,0$  min ( $p \leq 0,05$ ) w hipokampie kontralateralnym. Efekt MF był znoszony przez NAL. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że supresja cholinergicznym składowej rytmu theta na poziomie PPN może zachodzić za pośrednictwem receptorów opiodowych.

### **Wstęp**

Jedną ze struktur regulujących rytm theta w hipokampie jest jądro konarowo-mostowe nakrywki (PPN). PPN należy do części aktywującej układu siatkowatego pnia mózgu i leży w okolicy skrzyżowania górnych konarów

mózdzku. Inaktywacja farmakologiczna PPN (iniekcje prokainy) blokuje hipokampalny rytm theta u szczurów w narkozie uretanowej [10]. Wszystkie główne układy transmitterowe tego jądra są zaangażowane w procesy regulacji rytmu theta. I tak, pobudzenie układu cholinergicznego PPN (iniekcje karbacholu) indukuje aktywność theta [6,14], natomiast aktywacja układu glutaminergicznego i GABA-ergicznego hamuje tę aktywność [11]. Spośród stwierdzonych w PPN układów modulatorowych na szczególne zainteresowanie w aspekcie rytmu theta zasługuje układ opioidowy, reprezentowany tu przez receptory  $\mu$ -opiodowe [1]. O jego prawdopodobnym udziale w procesach związanych z oscylacjami theta można wnioskować pośrednio na podstawie doniesień dotyczących snu paradoksalnego, któremu u zwierząt towarzyszy w hipokampie rytm theta [3,4,7]. Ogólnie wiadomo, że opioidy hamują sen REM, np. podanie morfiny do tworu siatkowatego mostu, odgrywającego kluczową rolę w regulacji tej fazy snu, prowadziło do jej zahamowania [5]. Podobnie, efektem podskórnego podania morfiny była redukcja REM [13]. Ponadto stwierdzono, że morfina może obniżyć poziom acetylocholin w strukturach docelowych PPN [8] i sąsiadującego z nim jądra grzbietowo-bocznego nakrywki [9] biorących udział w regulacji snu paradoksalnego.

Celem niniejszej pracy było poznanie bezpośredniego wpływu opioidów na hipokampalny rytm theta na poziomie PPN. Rytm ten indukowano farmakologicznie iniekcją karbacholu do PPN u szczurów w narkozie uretanowej.

### Material i metody

*Zwierzęta.* Doświadczenia prowadzono na 19 szczurach, samcach szczepu Wistar o masie ciała 250 – 400 g. Szczury przebywały w warunkach sztucznego oświetlenia (12 godz./12 godz.), w pomieszczeniu o temperaturze  $22 \pm 1$  °C. Zwierzęta otrzymywały *ad libitum* wodę oraz standardowy pokarm w postaci peletek. Doświadczenia przebiegały zgodnie z wymogami Lokalnej Komisji Etycznej w Gdańsku, a procedury doświadczalne uzyskały akceptację tej Komisji.

*Związki użyte do iniekcji domózgowych.* Do iniekcji domózgowych stosowano następujące związki: agonista cholinergiczny - karbachol (KA) (chlorek karbamylcholin, RBI, USA); agonista opioidowy - morfina (MF) (chlorowodorek morfiny, Polfa, Kutno, Polska); antagonist opioidowy - nalokson (NAL) (chlorowodorek naloksonu, Sigma, USA). Wszystkie związki rozpuszczano w wodzie destylowanej w dniu doświadczenia.

*Implantacja elektrod rejestracyjnych i kaniul domózgowych.* Zarówno operację, jak i właściwe doświadczenia przeprowadzano w głębokiej narkozie

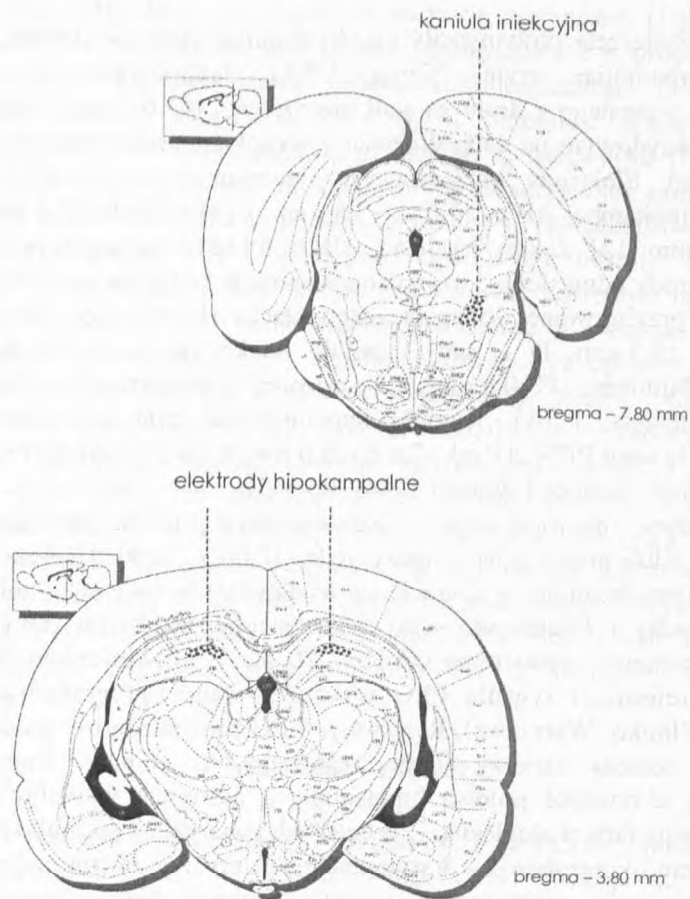
uretanowej. Zwierzęta otrzymywały *i.p.* 6-8 ml/kg 20% sterylnego roztworu uretanu (karbaminian etylu, Sigma, USA). Jednobiegunowe elektrody rejestracyjne wykonano z drutu ze stali nierdzewnej ( $\varnothing$  0,2 mm) izolowanego lakierem epoksydowym na całej długości z wyjątkiem zakończenia o długości około 0,5 mm. Elektrody implantowano obustronnie w warstwie komórek ziarnistych hipokampa: AP od -3,6 do -3,8 mm, L od  $\pm$ 2,0 do  $\pm$ 2,4 mm, D od -3,0 do -3,4 mm [12]. Zakres lokalizacji elektrod hipokampalnych pokazano na Ryc. 1. Elektrody odniesienia i uziemienia stanowiły śrubki ze stali nierdzewnej ( $\varnothing$  0,5 mm) przylutowane do pozłacanego złącza (koordynaty elektrod: AP -3,7 mm, L  $\pm$ 3,3 mm, D -1 mm). Kaniulę iniekcyjną stanowiła igła 10- $\mu$ l strzykawki Hamiltona ( $\varnothing$  0,5 mm) umieszczonej w jednostce do mikroiniekcji (Kopf Instruments, USA). Kaniula implantowana była jednostronnie, do prawego lub lewego PPN: AP od -7,8 do -8,0 mm, L od  $\pm$ 1,6 do  $\pm$ 1,7 mm, D od -7,0 do -7,2 mm (Paxinos i Watson 1998) (Ryc. 1).

*Procedura doświadczalna.* Doświadczenia miały przebieg ostry, a rejestrację EEG prowadzono między godz. 12.00 a 16.00. Uśpione podczas operacji i unieruchomione w aparacie stereotaktycznym zwierzęta umieszczano w klatce Faraday'a. Podłączano je do elektroencefalografu typu 16S (Medicor, Węgry) z pasmem przenoszenia 0,3 Hz – 70 Hz i próbkowaniem 240/s. Do podglądu i rejestracji sygnału EEG wykorzystywano oprogramowanie EEG DigiTrack (Elmiko, Warszawa). Rejestrację EEG prowadzono w sposób ciągły kontrolując poziom narkozy liczbą oddechów na minutę. Rejestrowano spontaniczną aktywność połową hipokampa, a następnie wywoływano rytm theta stymulacją farmakologiczną. U wszystkich zwierząt na początku rejestracji przeprowadzano kontrolnie 2-3 stymulacje sensoryczne (1-min tail-pinch, co 10 min), w celu sprawdzenia amplitudy rytmu theta. Doświadczenie kontynuowano, jeśli amplituda ta była  $\geq$  400  $\mu$ V. Po wprowadzeniu do PPN kaniuli i ponownym skontrolowaniu amplitudy rytmu theta (tail-pinch) podawano do PPN (przez ok. 3 min) następujące związki w zależności od grupy:

- 0,5  $\mu$ l roztworu karbacholu (10  $\mu$ g; grupa KA, n = 6)
- 0,5  $\mu$ l roztworu karbacholu łącznie z morfiną (odpowiednio 10+5  $\mu$ g; grupa KA+MF, n = 7)
- 0,5  $\mu$ l roztworu karbacholu łącznie z morfiną i naloksonem (odpowiednio 10+5+5  $\mu$ g; grupa KA+MF+NAL, n = 6).

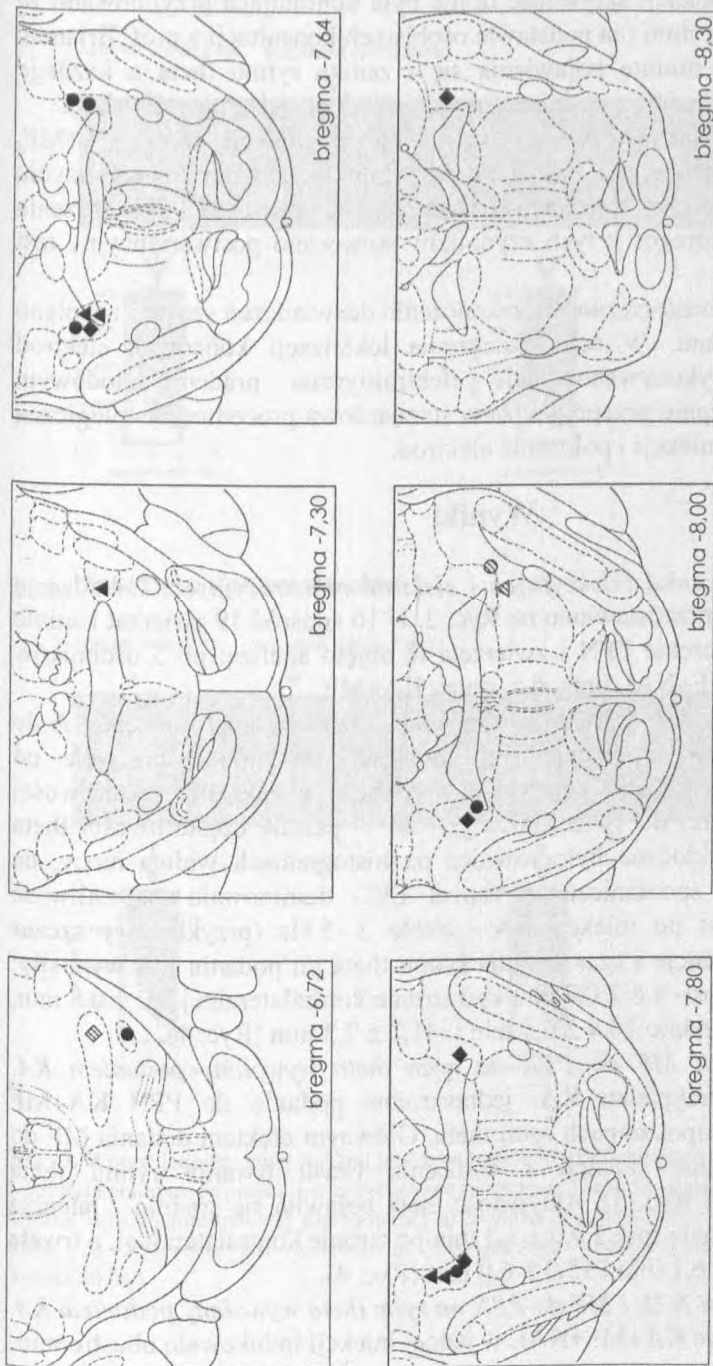
Obserwowano moment pojawiania się, trwanie i zanik indukowanego w ten sposób rytmu theta.

*Analiza wyników.* W celu określenia momentu pojawiania się (latencji) i czasu trwania rytmu theta analizowano fragmenty zapisu EEG z 1-min okresów tuż przed, w trakcie i po iniekcji. Z każdego okresu pobierano 3-5 wolnych od



**Ryc. 1.** Typowa lokalizacja kaniuli iniekcyjnej w PPN i zakres (we wszystkich grupach doświadczalnych) elektrod rejestracyjnych w hipokampie na przykładowych przekrojach z atlasu mózgu szczura Paxinosa i Watsona (1998). W obszarze hipokampa elektrody implantowano w górnej części zakrętu zębatego w warstwie komórek ziarnistych, skąd odbiera się sygnał rytmu theta o stosunkowo wysokiej amplitudzie [2].

artefaktów 5-s odcinków EEG. Próbkowanie zagęszczano do 5 odcinków/min, gdy w sygnale EEG pojawiała się i zanikała aktywność theta, tak aby dokładnie ustalić te momenty. Sygnał EEG analizowano przy pomocy szybkiej transformanty Fouriera (FFT) w odstępach co 0,12 Hz. W każdej próbie określano dominującą częstotliwość. Tę minutę zapisu, w której we wszystkich 5 próbkach dominowała częstotliwość w paśmie theta (zakres 2,5 – 6 Hz) przyjmowano za moment pojawienia się tego rytmu. Natomiast minutę, w której



**Ryc. 2.** Lokalizacja kaniul iniekcyjnych naniesiona na przekroje mózgu szczura z atlasu Paxinosa i Watsona [12] w grupach otrzymujących do PPN: ▲ karbachol (KA) (n = 5), ● karbachol z morfina w jednej iniekcji (KA+MF) (n = 6), ◆ karbachol z morfina i naloksonem w jednej iniekcji (KA+MF+NAL) (n = 5). U trzech szczurów iniekcje nastąpiły poza lub na granicy PPN: △ KA, ⊙ KA+MF, ◇ KA+MF+NAL. W przypadku tych lokalizacji rytm theta po podaniu związków nie pojawiał się lub trwał zaledwie ok. 1 min, co wskazuje na specyficzną anatomiczną efektywność obserwowanych w grupach doświadczalnych.

we wszystkich 5 próbkach aktywność ta nie była dominująca przyjmowano za moment zaniku tego rytmu (na podstawie osobistych konsultacji z prof. Brianem Blandem). Ustalano minutę pojawienia się i zaniku rytmu theta u każdego szczura osobno, a następnie uśredniano te wartości dla całej grupy ( $\bar{x} \pm SE$ ).

*Opracowanie statystyczne wyników.* Wpływ iniekcji (KA, KA+MF, KA+MF+NAL) na latencję i czas trwania rytmu theta badano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W przypadku stwierdzenia istotnego wpływu któregoś z tych czynników stosowano postwariancyjny test Tukey'a ( $p \leq 0,05$ ).

*Weryfikacja histologiczna.* Po zakończeniu doświadczeń szczury usypiano letalną dawką uretanu. W celu oznaczenia lokalizacji końcówek elektrod hipokampalnych wykonywano lezje elektrolityczne prądem anodowym (0,2 mA/20 s). Następnie przeprowadzano standardową procedurę histologiczną i określano miejsca iniekcji i położenie elektrod.

## Wyniki

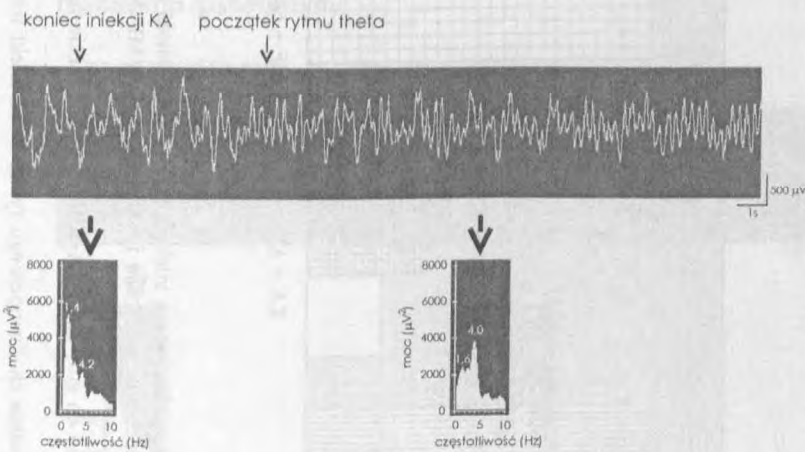
*Lokalizacja kaniul iniekcyjnych i elektrod rejestracyjnych.* Lokalizację kaniul iniekcyjnych przedstawiono na Ryc. 2. U 16 spośród 19 zwierząt kaniule znajdowały się w obrębie PPN i zwierzęta te objęto analizą: po 5 osobników z grupy KA i KA+MF+NAL oraz 6 z grupy KA+MF.

*Wpływ iniekcji KA do PPN na rytm theta.* Jednostronna iniekcja KA do PPN powodowała w hipokampalnych zapisach obu półkul przejście od wysokoamplitudowej, nieregularnej, wolnej aktywności w zakresie częstotliwości rytmu delta ( $< 2,5$  Hz) do synchronicznych fal w paśmie częstotliwości theta (2,5 - 6,0 Hz), co widoczne było również na histogramach widma mocy, na których w trakcie spontanicznego zapisu EEG dominowała częstotliwość 1 - 1,5 Hz, natomiast po iniekcji KA - około 3 - 5 Hz (przykładowy szczur Ryc. 3). Średnia latencja i czas trwania rytmu theta po podaniu KA wynosiły: latencja po stronie ipsi-  $1,8 \pm 0,7$  min i po stronie kontralateralnej  $2,0 \pm 0,8$  min, czas trwania odpowiednio  $40,4 \pm 6,4$  min i  $41,1 \pm 7,3$  min (Ryc. 4).

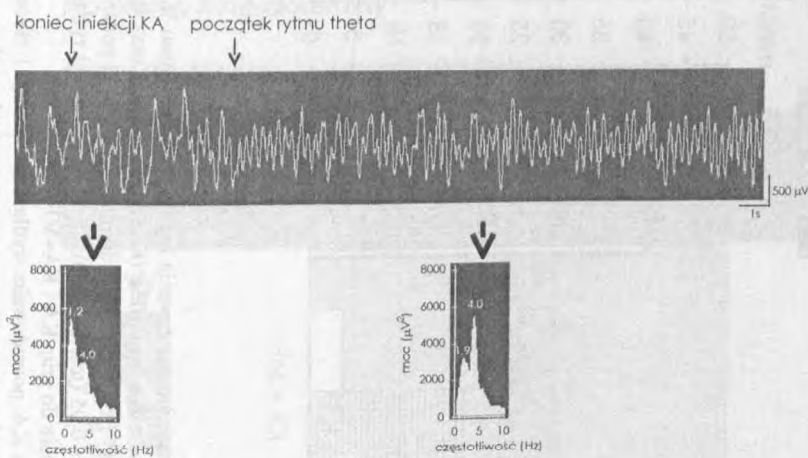
*Wpływ iniekcji MF do PPN na rytm theta wywołany podaniem KA.* Podobnie jak w przypadku KA, jednostronne podanie do PPN KA+MF indukowało w obu hipokampach rytm theta. Głównym efektem dodania MF do KA było wydłużenie latencji i skrócenie czasu trwania rytmu theta (przykładowy szczur Ryc. 5). Aktywność theta pojawiła się średnio z latencją  $4,0 \pm 1,5$  min po stronie ipsi- i  $9,0 \pm 1,3$  min po stronie kontralateralnej, a trwała odpowiednio  $18,6 \pm 6,1$  min i  $15,0 \pm 6,0$  min (Ryc. 4).

*Wpływ iniekcji NAL i MF do PPN na rytm theta wywołany podaniem KA.* Jednostronne podanie KA+MF+NAL w jednej iniekcji indukowało obustronnie

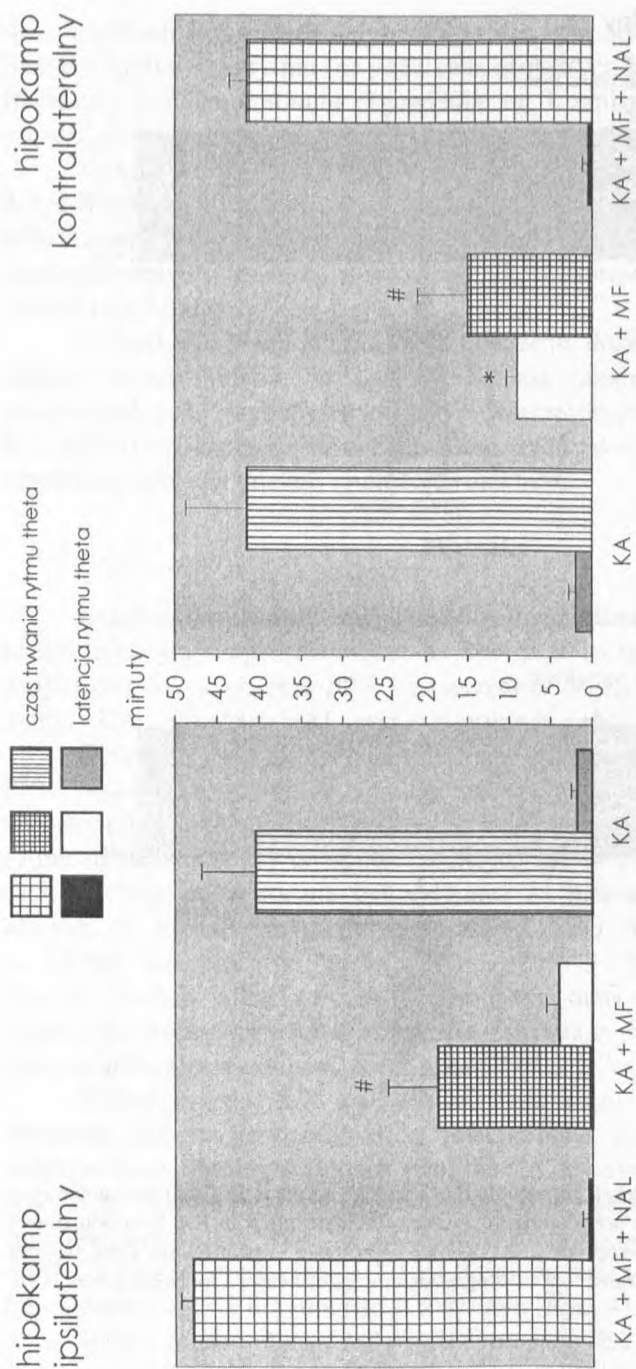
## hipokamp ipsilateralny



## hipokamp kontralateralny



**Ryc. 3.** Wpływ jednostronnej iniekcji karcholu (KA) do PPN na zapis EEG w hipokampie ipsi- i kontralateralnym do iniekcji u przykładowego szczura. Efektem podania KA była obustronna zmiana wysokoamplitudowej nieregularnej aktywności w zakresie częstotliwości delta w rytm theta, co widoczne jest również na histogramach częstotliwości (przedstawiono FFT 5-s odcinków).

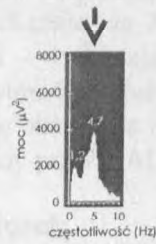
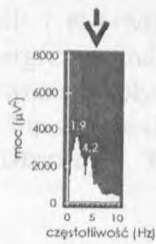


**Ryc. 4.** Porównanie latencji i czasu trwania hipokampalnego rytmu theta wywołanego jednostronną iniekcją do PPN karbacholu (KA, 10  $\mu$ g), karbacholu jednocześnie z morfiną (KA+MF, 10+5  $\mu$ g) oraz karbacholu jednocześnie z morfiną i naloksonem (KA+MF+NAL, 10+5+5  $\mu$ g) po stronie ipsi- i kontralateralnej do iniekcji. Wartości podano jako  $X \pm SE$ .  
 Objasnienia: \*, # -  $p \leq 0,05$  (test Tukey'a): \* różnice latencji rytmu w porównaniu do grup KA i KA+MF+NAL, # różnice czasu trwania rytmu w porównaniu do grup KA i KA+MF+NAL.  
 Dodanie MF do iniekcji KA powodowało wydłużenie latencji i skrócenie czasu trwania cholinergicznego rytmu theta. Efekt ten był znoszony przez podanie NAL – antagonistę receptorów opioidowych.



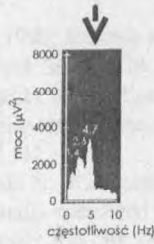
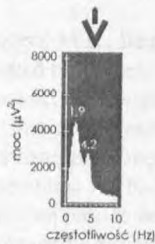
### hipokamp ipsilateralny

2 min po iniekcji KA + MF      początek rytmu theta



### hipokamp kontralateralny

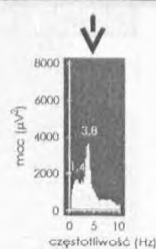
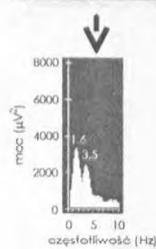
4 min po iniekcji KA + MF      początek rytmu theta



**Ryc. 5.** Wpływ jednostronnej iniekcji karbacholu łącznie z morfiną (KA+MF) do PPN na zapis EEG w hipokampie ipsi- i kontralateralnym do iniekcji u przykładowego szczura. Efektem podania KA+MF była obustronna zmiana wysokoamplitudowej nieregularnej aktywności w zakresie częstotliwości delta w rytm theta, co widoczne jest również na histogramach częstotliwości (przedstawiono FFT 5-s odcinków). Po iniekcji KA+MF rytm theta pojawiał się obustronnie później (oraz trwał krócej) niż po podaniu KA.

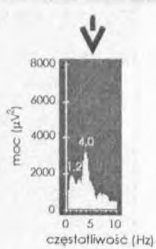
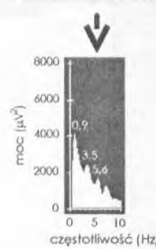
### hipokamp ipsilateralny

koniec iniekcji KA + MF + NAL      początek rytmu theta



### hipokamp kontralateralny

koniec iniekcji KA + MF + NAL      początek rytmu theta



**Ryc. 6.** Wpływ jednostronnej iniekcji karbacholu łącznie z morfiną i naloksonem (KA+MF+NAL) do PPN na zapis EEG w hipokampie ipsi- i kontralateralnym do iniekcji u przykładowego szczura. Efektem podania KA+MF+NAL była obustronna zmiana wysokoamplitudowej nieregularnej aktywności w zakresie częstotliwości delta w rytm theta, co widoczne jest również na histogramach częstotliwości (przedstawiono FFT 5-s odcinków). Po podaniu KA+MF+NAL rytm theta pojawiał się obustronnie szybciej (i trwał dłużej) niż po iniekcji KA+MF.

rytm theta, który pojawiał się szybciej i trwał dłużej niż po podaniu KA+MF, a wielkości te były porównywalne z analogicznymi parametrami w grupie KA. Dodanie NAL znosiło stwierdzone w grupie KA+MF wydłużenie latencji i skrócenie czasu trwania rytmu theta (przykładowy szczur Ryc. 6). Średnia latencja tego rytmu w obu hipokampach wynosiła  $0,6 \pm 0,6$  min, a czas jego trwania:  $47,8 \pm 1,5$  min po stronie ipsi- i  $41,4 \pm 7,3$  min po stronie kontralateralnej (Ryc. 4).

*Porównanie rytmu theta w grupach KA, KA+MF i KA+MF+NAL.* Zestawienie analizowanych parametrów rytmu theta między grupami KA, KA+MF i KA+MF+NAL (Ryc. 4) pokazuje, że MF obustronnie hamowała cholinergicznie indukowany rytm theta – wydłużając jego latencję i skracając czas trwania. Wpływ na czas trwania rytmu był silniejszy i istotny statystycznie w obu hipokampach, wpływ na latencję okazał się istotny tylko w hipokampie kontralateralnym. Efekt MF był znoszony przez NAL.

### Wniosek

Uzyskane wyniki wskazują, że, na poziomie PPN, układ opioidowy może hamować cholinergiczną komponentę rytmu theta u szczurów w narkozie uretanowej oraz że supresja ta zachodzi przy udziale receptorów opioidowych.

### Piśmiennictwo

1. Capece M.L., Baghdoyan H.A., Lydic R. (1998) Opioids activate G proteins in REM sleep-related brain stem nuclei of rat. *Neuroreport* 9: 3025-3028.
2. Buzsaki G., Czopf J., Kondakor I., Kellenyi L. (1986) Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: current-source density analysis, effects of urethane and atropine. *Brain Res.* 365: 125-137.
3. Karashima A., Nakao M., Honda K., Iwasaki N., Katayama N., Yamamoto M. (2004) Theta wave amplitude and frequency are differentially correlated with pontine waves and rapid eye movements during REM sleep in rats. *Neurosci. Res.* 50: 283-289.
4. Karashima A., Nakao M., Katayama N., Honda K. (2005) Instantaneous acceleration and amplification of hippocampal theta wave coincident with phasic pontine activities during REM sleep. *Brain Res.* 1051: 50-56.
5. Keifer J.C., Baghdoyan H.A., Lydic R. (1992) Sleep disruption and increased apneas after pontine microinjection of morphine. *Anesthesiology* 77: 973-982.
6. Kinney G.G., Vogel G.W., Feng P. (1998) Brainstem carbachol injections in the urethane anesthetized rat produce hippocampal theta rhythm and cortical desynchronization:

- a comparison of pedunclopontine tegmental versus nucleus pontis oralis injections. *Brain Res.* 809: 307-313.
7. Leung L.S. (1984) Theta rhythm during REM sleep and waking: correlations between power, phase and frequency. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 58: 553-564.
  8. Lydic R., Keifer J.C., Baghdoyan H.A., Becker L. (1993) Microdialysis of the pontine reticular formation reveals inhibition of acetylcholine release by morphine. *Anesthesiology* 79: 1003-1012.
  9. Mortazavi S., Thompson J., Baghdoyan H.A., Lydic R. (1999) Fentanyl and morphine, but not remifentanyl, inhibit acetylcholine release in pontine regions modulating arousal. *Anesthesiology* 90: 1070-1077.
  10. Nowacka A., Jurkowlanec E., Trojnar W. (2002) Microinjection of procaine into the pedunclopontine tegmental nucleus suppresses hippocampal theta rhythm in urethane-anesthetized rats. *Brain Res. Bull.* 58: 377-384.
  11. Nowacka A., Trojnar W. (2000) Influence of GABA-ergic and glutamatergic transmission in the pedunclopontine tegmental nucleus on hippocampal theta activity. *Eur. J. Neurosci.* 12 Suppl 11: 80.
  12. Paxinos G., Watson C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego.
  13. Robert C., Stinus L., Limoge A. (1999) Sleep impairments in rats implanted with morphine pellets. *Neuropsychobiology* 40: 214-217.
  14. Vertes R.P., Colom L.V., Fortin W.J., Bland B.H. (1993) Brainstem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp. Brain Res.* 96: 419-429.

Adres do korespondencji:

**Emilia Leszkowicz**

Katedra Fizjologii Zwierząt

Uniwersytet Gdański

ul. Kładki 24

80-822 Gdańsk

tel. (48 58) 301 22 41 w. 6386

e-mail: [eremita@biotech.univ.gda.pl](mailto:eremita@biotech.univ.gda.pl)