

HANNA ĆWIKAŁOWSKA<sup>1,2</sup>, WOJCIECH GLAC<sup>2</sup>

**WPLYW AMFETAMINY NA OBRAZ BIAŁOKRWINKOWY W WARUNKACH  
BLOKADY RECEPTORÓW  $\alpha$ - I  $\beta$ -ADRENERGICZNYCH  
U SZCZURÓW RÓŻNIĄCYCH SIĘ POZYCJĄ SOCJALNĄ**

**THE EFFECT OF AMPHETAMINE ON LEUKOCYTE POPULATIONS  
IN THE PERIPHERAL BLOOD UNDER  $\alpha$ - AND  $\beta$ -ADRENERGIC BLOCKADE  
IN RATS DIFFERING IN SOCIAL POSITION**

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Fizjologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: dr hab. med. Tomasz Wierzbą

<sup>2</sup> Katedra Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Gdańskiego  
kierownik: dr hab. Danuta Lewandowska, prof. UG

Celem pracy była ocena udziału układu adrenergicznego we wpływie amfetaminy (AMPH) na obraz białokrwinkowy krwi obwodowej u szczurów różniących się pozycją socjalną. U szczurów zróżnicowanych w oparciu o test interakcji socjalnych na dominujące (D) oraz submisywne (S) oznaczano liczbę leukocytów oraz ich poszczególnych populacji po jednorazowej iniekcji 1 mg/kg AMPH przy blokadzie receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych. Jednorazowa iniekcja AMPH wywoływała wyraźną tendencję do leukopenii, która osiągała istotność statystyczną w warunkach blokady receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych (oraz łącznej blokady receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych). AMPH prowadziła do limfopenii, która była bardziej nasiloną u szczurów S. Efekt ten był niezależny od receptorów adrenergicznych. Wywoływana przez AMPH granulocytoza oraz jej międzygrupowe zróżnicowanie (efekt większy u szczurów S) związane były z receptorami  $\alpha$ -adrenergicznymi. AMPH wywoływała monocytozę tylko u szczurów S. Efekt ten był zależny od receptorów  $\beta$ -adrenergicznych. Otrzymane wyniki wskazują, że podawanie AMPH może wywoływać limfopenię, granulocytozę i monocytozę we krwi obwodowej, przy czym szczury S wykazują silniejszą reaktywność badanych parametrów układu odpornościowego na AMPH w porównaniu ze zwierzętami D. Wydaje się, że wywołane przez AMPH zmiany w obrazie białokrwinkowym, jak również zróżnicowanie międzygrupowe tych zmian wykazują częściową zależność od receptji adrenergicznej.

Działanie amfetaminy (AMPH) wykazuje szerokie spektrum i obejmuje aktywację procesów psychicznych, neurochemicznych, neurohormonalnych, a także wegetatywnych. Wynika to z pobudzenia głównych układów efektorowych i modulacyjnych w ośrodkowym oraz obwo-

dowym układzie nerwowym. AMPH jest typową aminą sympatykomimetyczną o działaniu pośrednim [11]. Molekularny mechanizm tej aktywacji polega z jednej strony na indukcji wysiewu katecholamin (dopaminy, noradrenaliny i adrenaliny), a także serotoniny z błony presynaptycznej, a z drugiej strony na blokadzie zwrotnego wychwytu tych neuroprzekaźników oraz hamowaniu monoaminooksydazy, która odpowiada za ich rozkład [11]. Skutkuje to podwyższeniem stężenia neurotransmiterów w synapsie, a także wydłużeniem czasu ich oddziaływania na receptory postsynaptyczne [11]. Takie same procesy zachodzą, obok ośrodkowego układu nerwowego, również w neuronach katecholaminergicznego układu współczulnego, co prowadzi do wzrostu poziomu adrenaliny i noradrenaliny we krwi i tkankach obwodowych. Objawia się to takimi efektami wegetatywnymi jak: przyspieszenie akcji serca, wzrost skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi czy wzrost wentylacji płucnej [11].

Amfetamina i jej pochodne wpływają również na układ odpornościowy. Większość autorów uważa, że wpływ ten jest immunosupresyjny [5, 10]. Amfetamina może wpływać na układ odpornościowy pośrednio lub bezpośrednio. Uważa się, że AMPH moduluje układ odpornościowy poprzez osie hormonalne – PWN i PPN [10], jakkolwiek do tej pory opublikowano niewielką liczbę prac poświęconych badaniom mechanizmów działania immunomodulacyjnego AMPH. Z uwagi na sympatykomimetyczne działanie AMPH, jej pośredni wpływ należy łączyć z działaniem katecholamin, które za pośrednictwem receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych, obecnych w dużej liczbie na leukocytach i komórkach tkanek limfoidalnych, wywierają znaczny wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego [3].

W ostatnich latach duże zainteresowanie budzi zagadnienie indywidualnego zróżnicowania podatności na uzależnienie oraz odpowiedzi na środki psychotropowe. Jedną z cech, którą można łączyć z potencjalnym zróżnicowaniem odpowiedzi na środki psychotropowe, takie jak AMPH, jest pozycja socjalna. Wykazano, że osobniki dominujące (D) i podporządkowane – submisywne (S) różnią się podatnością na stres [8] i reaktywnością układu odpornościowego na stres [12]. Co więcej, opisano zróżnicowaną podatność na uzależnienie od psychostymulantów osobników D i S [14]. Osobniki D i S różnią się ponadto reaktywnością osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (PPN) oraz aktywnością współczulno-nadnerczową (PWN), przy czym zwierzęta D wykazują wyższy poziom adrenaliny i noradrenaliny w osoczu, natomiast zwierzęta S wyższy poziom kortykosteronu [8].

Mimo że uzależnienie od środków psychostymulujących stanowi istotny problem społeczny i medyczny, wpływ AMPH, najważniejszego przedstawiciela tej grupy związków, na układ odpornościowy pozostaje wciąż nie w pełni wyjaśniony. Dotyczy to również oddziaływania AMPH na liczebność leukocytów i poszczególnych ich populacji, które stanowią w pełni uznawalny i miarodajny wskaźnik stanu odporności osobnika. Z doświadczeń wstępnych prowadzonych w Katedrze Fizjologii Zwierząt wynika, że AMPH istotnie wpływa na obraz białokrwinkowy. Dane te pokazują, że z jednej strony wpływ ten może być związany z pośrednim wpływem katecholamin, a z drugiej strony może być silnie uzależniony od pozycji socjalnej osobnika.

Niniejszą pracę poświęcono weryfikacji tych wstępnych obserwacji i ocenie udziału układu adrenergicznego we wpływie AMPH na obraz białokrwinkowy u szczurów różniących się pozycją socjalną. W tym celu u szczurów dominujących i submisywnych jednorazową iniekcją AMPH poprzedzono podaniem niespecyficznego antagonisty receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych (fentolaminy) i  $\beta$ -adrenergicznych (propranololu). Oznaczono liczbę leukocytów, limfocytów, granulocytów oraz monocytów.

## CEL PRACY

Celem pracy była ocena udziału układu adrenergicznego we wpływie AMPH na obraz białokrwińkowy u szczurów różniących się pozycją socjalną.

## MATERIAŁ I METODY

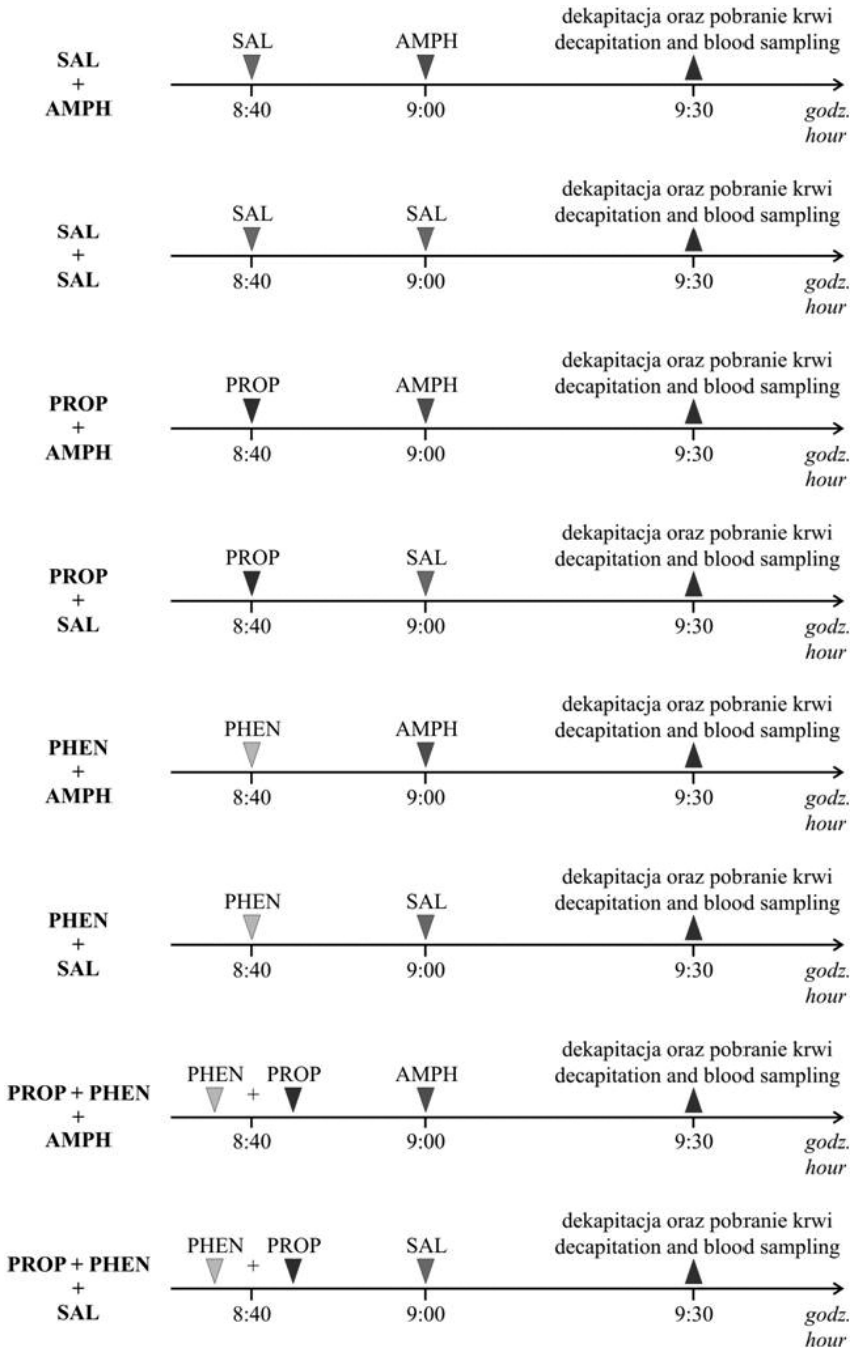
Doświadczenia wykonano na szczurach, samcach szczepu Wistar, w wieku około 12 tygodni, o początkowej masie ciała  $200 \pm 20$  g. Zwierzęta przebywały w oddzielnych klatkach hodowlanych, w warunkach sztucznego oświetlenia, cyklicznie wyłączanego w godzinach 18.00–6.00. Zwierzęta miały swobodny dostęp do pożywienia w postaci paetek i wody z wyjątkiem czasu trwania testów behawioralnych. Przed rozpoczęciem doświadczeń przez 7 kolejnych dni zwierzęta były przyzwyczajane do eksperymentatora.

### Grupy behawioralne – test interakcji socjalnych

Zwierzęta podzielono losowo na grupy po 6 szczurów. W każdej grupie przeprowadzano testy interakcji socjalnych w systemie „każdy z każdym”. Zwierzęta umieszczane były parami w klatce obserwacyjnej o wymiarach  $35 \times 25 \times 44$  cm, identycznej z klatkami mieszkalnymi zwierząt. Zachowanie zwierząt obserwowano przez 15 minut, rejestrowano na etogramie i dzielono na cztery kategorie zachowań: zachowania agresywne (atak, gryzienie, pozycja *on the top*), zachowania obronne (unikanie, znieruchomienie, pozycja *on the back*), zachowania ambiwalentne (boksowanie, grożenie, zwracanie uwagi) oraz zachowania obojętne (eksploracja, mycie się). Testy przeprowadzano w godzinach 12.00–16.00. Harmonogram testów zaplanowano tak, aby dla każdego zwierzęcia przerwy pomiędzy kolejnymi pojedynkami wynosiły około 48 godzin. W celu zmniejszenia wpływów nowego otoczenia doświadczenia były przeprowadzane w zwierzętarni. Do oceny pozycji socjalnej brano pod uwagę wyłącznie zachowania agresywne oraz obronne. Na ich podstawie dla każdego osobnika wyznaczano współczynnik agresywności (WAGRES) dzieląc łączną liczbę zachowań agresywnych we wszystkich pojedynkach przez sumę liczby zachowań agresywnych oraz liczby zachowań obronnych we wszystkich pojedynkach. Szczura uznawano za D, gdy WAGRES wynosił powyżej 0,55, natomiast za S, gdy WAGRES był mniejszy od 0,45. Zwierząt o WAGRES w przedziale 0,45–0,55 nie brano pod uwagę w dalszych czynnościach doświadczalnych.

### Grupy doświadczalne

Szczury podzielono losowo na 8 grup doświadczalnych i kontrolnych (ryc. 1). Szczury otrzymały jednorazową iniekcję AMPH poprzedzoną podaniem soli fizjologicznej (SAL+AMPH), dwie iniekcje soli fizjologicznej (SAL+SAL), iniekcję AMPH poprzedzoną podaniem antagonisty receptorów  $\beta$ -adrenergicznych propranololu (PROP+AMPH), iniekcję soli fizjologicznej poprzedzoną podaniem propranololu (PROP+SAL), iniekcję AMPH poprzedzoną podaniem antagonisty receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych fentolaminy (PHEN+AMPH),



Ryc. 1. Grupy doświadczalne oraz procedura doświadczalna

Fig. 1. Experimental groups and procedure

iniekcję soli fizjologicznej poprzedzoną podaniem fentolaminy (PHEN+SAL), iniekcję AMPH poprzedzoną podaniem antagonistów receptorów adrenergicznych propranololu i fentolaminy (PROP+PHEN+AMPH) lub iniekcję soli fizjologicznej poprzedzoną podaniem propranololu i fentolaminy (PROP+PHEN+SAL).

Pierwszą iniekcję (PROP, PHEN lub SAL) przeprowadzano o godzinie 8.40, natomiast drugą (AMPH lub SAL) o godzinie 9.00. Krew, po dekapitacji zwierząt, pobierano 30 minut po drugiej iniekcji. Wszystkie grupy doświadczalne oraz kontrolne składały się z równej liczby osobników każdej grupy behawioralnej (ryc. 1).

#### Podawanie amfetaminy

Siarczan D-amfetaminy (Sigma, USA) rozpuszczano w SAL (Natrium chloratum 0,9% inj., Polfa) doprowadzając do stężenia 1 mg/ml i podawano dootrzewnowo (i.p.) w objętości 1 ml/kg m.c. W grupach kontrolnych zwierzęta otrzymywały SAL w dawce 1 ml/kg m.c. Wszystkie iniekcje, celem wyeliminowania wpływu nowego otoczenia, przeprowadzano w zwierzętarni zgodnie ze schematem doświadczenia (ryc. 1).

#### Blokada receptorów adrenergicznych

Chlorowodorek DL-propranololu (Sigma, USA) rozpuszczano w SAL doprowadzając do stężenia 5 mg/ml i podawano i.p. w objętości 1 ml/kg m.c. Chlorowodorek fentolaminy (Sigma, USA) rozpuszczano w SAL doprowadzając do stężenia 5 mg/ml i podawano i.p. w objętości 1 ml/kg m.c. W grupach kontrolnych zwierzęta otrzymywały SAL w dawce 1 ml/kg m.c. Wszystkie iniekcje, celem wyeliminowania wpływu nowego otoczenia, przeprowadzano w zwierzętarni zgodnie ze schematem doświadczenia (ryc. 1).

#### Pobieranie prób krwi

Próby krwi pobierano zgodnie ze schematami doświadczeń (ryc. 1). Krew (o objętości około 5 ml) pochodzącą z tułowia pobierano po dekapitacji zwierząt do schłodzonych probówek z roztworem 5% wersenianu dwusodowego (w ilości 50  $\mu$ l na 1 ml krwi) i umieszczano w lodzie. W każdej pobranej próbce krwi oznaczono liczbę leukocytów, limfocytów, granulocytów i monocytów.

#### Oznaczanie liczby leukocytów, limfocytów, granulocytów i monocytów

Ogólną liczbę leukocytów we krwi obwodowej oznaczano przy użyciu analizatora hematologicznego (Baker System 9120 CP, Biochem Immunosystems, USA). Procentową zawartość limfocytów, granulocytów i monocytów obliczono z rozmazów krwi obwodowej wybarwionych w cytowirówce (Wescor „Aerospray Hematology” 7120 – Hematology Staining Cyto centrifuge, Logan, USA). Procent komórek poszczególnych populacji leukocytów określano w stosunku

do 200 leukocytów obserwowanych w mikroskopowym obrazie rozmazu. Bezwzględną liczbę limfocytów, granulocytów i monocytów we krwi obwodowej obliczano na podstawie całkowitej liczby leukocytów krwi obwodowej.

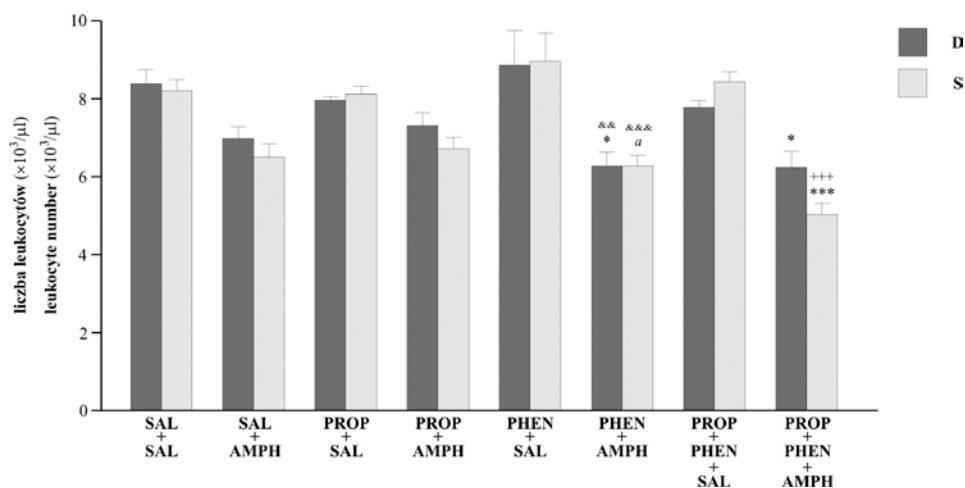
### Analiza statystyczna

Wyniki prezentowane są jako średnia  $\pm$  błąd standardowy średniej ( $M \pm SE$ ). Otrzymane dane analizowano statystycznie przy pomocy dwuczynnikowej analizy wariancji oraz testu Tukey'a.

## WYNIKI

### Liczba leukocytów

Wpływ blokady receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych na indukowane przez AMPH zmiany liczby leukocytów we krwi obwodowej u szczurów D i S przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Wpływ blokady receptorów adrenergicznych typu  $\alpha$  i  $\beta$  na indukowane przez amfetaminę zmiany liczby leukocytów we krwi obwodowej u szczurów dominujących (D) i submisywnych (S). SAL, sól fizjologiczna; AMPH, amfetamina; PROP, propranolol; PHEN, fentolamina; \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ ;  $a$   $p = 0,071$  – istotność różnic w porównaniu z SAL+SAL; &&&  $p < 0,001$ ; &&  $p < 0,01$  – w porównaniu z PHEN+SAL; +++  $p < 0,001$  – w porównaniu z PHEN+PROP+SAL

Fig. 2. Effect of blockade of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors on the amphetamine-induced changes in the number of leukocytes in the peripheral blood in dominant (D) and submissive (S) rats. SAL, saline; AMPH, amphetamine; PROP, propranolol; PHEN, phentolamine; \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ ;  $a$   $p = 0,071$  – significance of differences compared with SAL+SAL; &&&  $p < 0,001$ ; &&  $p < 0,01$  – compared with PHEN+SAL; +++  $p < 0,001$  – compared with PHEN+PROP+SAL

Tabela I. Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji – wpływ grupy doświadczalnej i grupy behawioralnej oraz interakcji między tymi czynnikami na badane parametry

Table I. Results of two-way analysis of variance – the effects of the experimental group, behavioral group and interactions among these factors on the studied parameters

Parametr Parameter	Czynnik Factor	F	p
Liczba leukocytów The number of leucocytes	grupa doświadczalna experimental group	16,120	0,001
	grupa behawioralna behavioral group	0,845	ns
	interakcja grupa dośw. × grupa beh. interaction exp. group × beh. group	0,986	ns
Liczba limfocytów The number of lymphocytes	grupa doświadczalna experimental group	25,776	0,001
	grupa behawioralna behavioral group	0,490	ns
	interakcja grupa dośw. × grupa beh. interaction exp. group × beh. group	0,978	ns
Liczba granulocytów The number of granulocytes	grupa doświadczalna experimental group	17,312	0,001
	grupa behawioralna behavioral group	0,389	ns
	interakcja grupa dośw. × grupa beh. interaction exp. group × beh. group	0,686	ns
Liczba monocytów The number of monocytes	grupa doświadczalna experimental group	8,131	0,001
	grupa behawioralna behavioral group	3,338	0,071
	interakcja grupa dośw. × grupa beh. interaction exp. group × beh. group	1,734	ns

ns – brak istotności statystycznej / not significant

Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji dla wpływu grupy doświadczalnej i grupy behawioralnej oraz interakcji między tymi czynnikami na liczbę leukocytów oraz pozostałych badanych parametrów zawarto w tab. I.

U zwierząt dominujących (D) liczba leukocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych (PHEN+AMPH) była o 25% ( $p < 0,05$ ) niższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL) i o 29% ( $p < 0,01$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji PHEN (PHEN+SAL). Liczba leukocytów po podaniu AMPH przy łącznej blokadzie receptorów

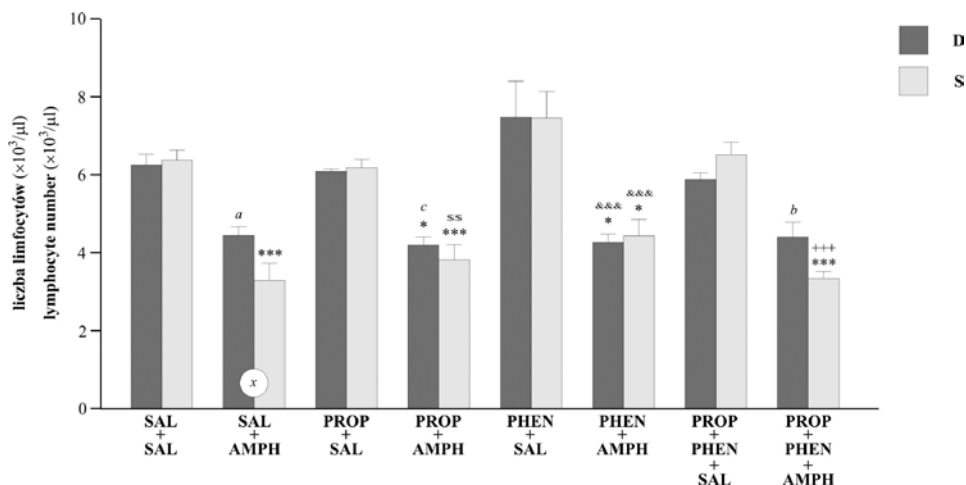
$\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+PHEN+AMPH) była o 26% ( $p<0,05$ ) niższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL).

U zwierząt submisywnych (S) liczba leukocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych (PHEN+AMPH) była o 23% ( $p=0,071$ ) niższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL) i o 30% ( $p<0,001$ ) niższa w porównaniu z iniekcją PHEN (PHEN+SAL). Liczba leukocytów po podaniu AMPH przy łącznej blokadzie receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+PHEN+AMPH) była o 39% ( $p<0,001$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji SAL (SAL+SAL) i o 40% ( $p<0,001$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji PROP i PHEN (PROP+PHEN+SAL).

### Liczba limfocytów

Wpływ blokady receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych na indukowane przez AMPH zmiany liczby limfocytów we krwi obwodowej u szczurów D i S przedstawiono na ryc. 3.

U zwierząt dominujących (D) liczba limfocytów po podaniu AMPH (SAL+AMPH) była o 29% ( $p=0,052$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji SAL (SAL+SAL). Liczba limfocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+AMPH)



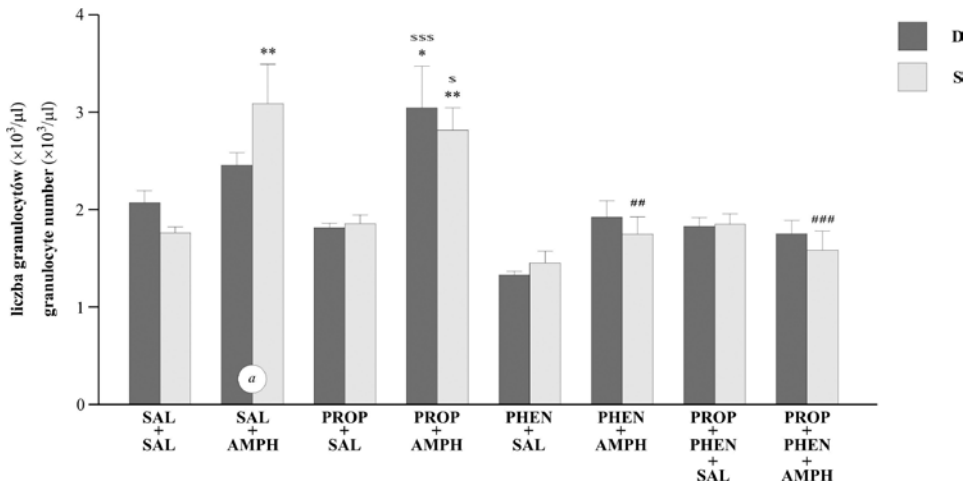
Ryc. 3. Wpływ blokady receptorów adrenergicznych typu  $\alpha$  i  $\beta$  na indukowane przez amfetaminę zmiany liczby limfocytów we krwi obwodowej u szczurów dominujących (D) i submisywnych (S). SAL, sól fizjologiczna; AMPH, amfetamina; PROP, propranolol; PHEN, fentolamina; \*\*\* $p<0,001$ ; \* $p<0,05$ ; a  $p=0,052$ ; b=0,081 – istotność różnic w porównaniu z SAL+SAL; \$\$  $p<0,01$ ; c  $p=0,067$  – w porównaniu z PROP+SAL; &&&  $p<0,001$  – w porównaniu z PHEN+SAL; +++  $p<0,001$  – w porównaniu z PROP+PHEN+SAL; x  $p<0,05$  – pomiędzy grupami behawioralnymi

Fig. 3. Effect of blockade of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors on the amphetamine-induced changes in the number of lymphocytes in the peripheral blood in dominant (D) and submissive (S) rats. SAL, saline; AMPH, amphetamine; PROP, propranolol; PHEN, phentolamine; \*\*\* $p<0,001$ ; \* $p<0,05$ ; a  $p=0,052$  – significance of differences compared with SAL+SAL; \$\$  $p<0,01$ ; c  $p=0,067$  – compared with PROP+SAL; &&&  $p<0,001$  – compared with PHEN+SAL; +++  $p<0,001$  – compared with PHEN+PROP+SAL; x  $p<0,05$  – between behavioral groups



była o 33% ( $p < 0,05$ ) niższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL) i o 31% ( $p = 0,067$ ) niższa w porównaniu z iniekcją PROP (PROP+SAL). Liczba limfocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych (PHEN+AMPH) była o 32% ( $p < 0,05$ ) niższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL) i o 43% ( $p < 0,001$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji PHEN (PHEN+SAL). Liczba limfocytów po podaniu AMPH przy łącznej blokadzie receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+PHEN+AMPH) była o 30% ( $p = 0,081$ ) niższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL).

U zwierząt submisywnych (S) liczba limfocytów po podaniu AMPH (SAL+AMPH) była o 48% ( $p < 0,001$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji SAL (SAL+SAL). Liczba limfocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+AMPH) była o 40% ( $p < 0,001$ ) niższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL) i o 38% ( $p < 0,01$ ) niższa w porównaniu z podaniem PROP (PROP+SAL). Liczba limfocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych (PHEN+AMPH) była o 30% ( $p < 0,05$ ) niższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL) i o 41% ( $p < 0,001$ ) niższa w porównaniu z iniekcją PHEN (PHEN+SAL). Liczba limfocytów po podaniu AMPH przy łącznej blokadzie receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+PHEN+AMPH) była o 48% ( $p < 0,001$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji SAL (SAL+SAL) i o 49% ( $p < 0,001$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji PROP i PHEN (PROP+PHEN+SAL).



Ryc. 4. Wpływ blokady receptorów adrenergicznych typu  $\alpha$  i  $\beta$  na indukowane przez amfetaminę zmiany liczby granulocytów we krwi obwodowej u szczurów dominujących (D) i submisywnych (S). SAL, sól fizjologiczna; AMPH, amfetamina; PROP, propranolol; PHEN, fentolamina; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  – istotność różnic w porównaniu z SAL+SAL; ###  $p < 0,001$ ; ##  $p < 0,01$  – w porównaniu z SAL+AMPH; \$\$\$  $p < 0,001$ ; \$  $p < 0,05$  – w porównaniu z PROP+SAL; a  $p = 0,072$  – pomiędzy grupami behawioralnymi

Fig. 4. Effect of blockade of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors on the amphetamine-induced changes in the number of granulocytes in the peripheral blood in dominant (D) and submissive (S) rats. SAL, saline; AMPH, amphetamine; PROP, propranolol; PHEN, phentolamine; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  – significance of differences compared with SAL+SAL; ###  $p < 0,001$ ; ##  $p < 0,01$  – compared with SAL+AMPH; \$\$\$  $p < 0,001$ ; \$  $p < 0,05$  – compared with PROP+SAL; a  $p = 0,072$  – between behavioral groups

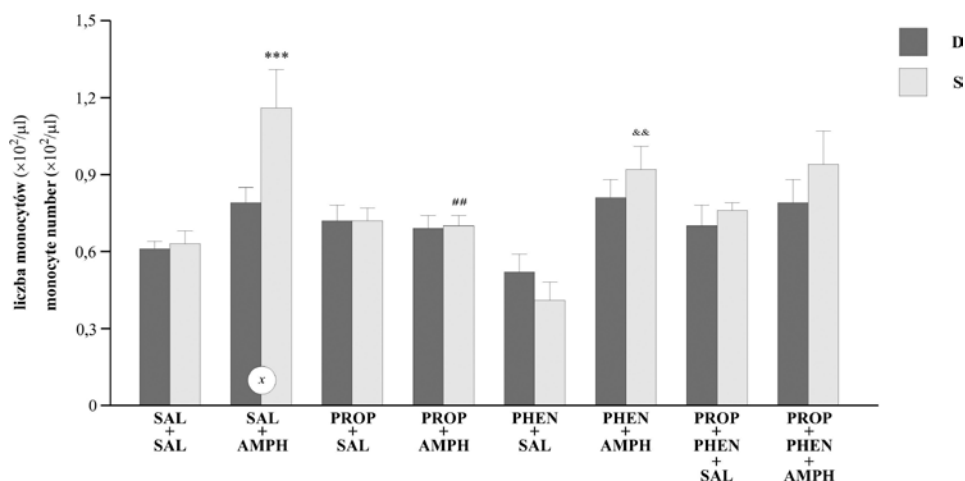
Szczury D i S wykazywały zróżnicowany poziom liczby limfocytów. Po podaniu AMPH (SAL+AMPH) liczba limfocytów u szczurów D była o 35% ( $p<0,05$ ) wyższa w porównaniu z S.

### Liczba granulocytów

Wpływ blokady receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych na indukowane przez AMPH zmiany liczby granulocytów we krwi u szczurów D i S przedstawiono na ryc. 4.

U zwierząt dominujących (D) liczba granulocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+AMPH) była o 47% ( $p<0,05$ ) większa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL) i o 68% ( $p<0,001$ ) wyższa w porównaniu z iniekcją PROP (PROP+SAL).

U zwierząt submisywnych (S) liczba granulocytów po podaniu AMPH (SAL+AMPH) była o 75% ( $p<0,01$ ) wyższa w porównaniu z poziomem po iniekcji SAL (SAL+SAL). Liczba granulocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+AMPH) była o 60% ( $p<0,01$ ) wyższa w porównaniu z iniekcją SAL (SAL+SAL) i o 52% ( $p<0,05$ ) wyższa w porównaniu z podaniem PROP (PROP+SAL). Liczba granulocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych (PHEN+AMPH) była o 43% ( $p<0,01$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji AMPH bez blokady  $\alpha$ -adrenergicznej (SAL+AMPH). Liczba



Ryc. 5. Wpływ blokady receptorów adrenergicznych typu  $\alpha$  i  $\beta$  na indukowane przez amfetaminę zmiany liczby monocytów we krwi obwodowej u szczurów dominujących (D) i submisywnych (S). SAL, sól fizjologiczna; AMPH, amfetamina; PROP, propranolol; PHEN, fentolamina; \*\*\*  $p<0,001$  – istotność różnic w porównaniu z SAL+SAL; ##  $p<0,01$  – w porównaniu z SAL+AMPH; \*\*  $p<0,01$  – w porównaniu z PHEN+SAL; x  $p<0,05$  – pomiędzy grupami behawioralnymi

Fig. 5. Effect of blockade of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors on the amphetamine-induced changes in the number of monocytes in the peripheral blood in dominant (D) and submissive (S) rats. SAL, saline; AMPH, amphetamine; PROP, propranolol; PHEN, phentolamine; \*\*\* $p<0,001$  – significance of differences compared with SAL+SAL; ##  $p<0,01$  – compared with SAL+AMPH; \*\*  $p<0,01$  – compared with PHEN+SAL; x  $p<0,05$  – between behavioral groups

granulocytów po podaniu AMPH przy łącznej blokadzie receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+PHEN+AMPH) była o 49% ( $p<0,001$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji AMPH bez blokady adrenergicznej (SAL+AMPH).

Szczury D i S wykazywały zróżnicowany poziom liczby granulocytów. Po podaniu AMPH (SAL+AMPH) liczba granulocytów u szczurów D była o 20% ( $p=0,072$ ) niższa w porównaniu z S.

### Liczba monocytów

Wpływ blokady receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych na indukowane przez AMPH zmiany liczby monocytów we krwi obwodowej u szczurów D i S przedstawiono na ryc. 5.

U zwierząt submisyjnych (S) liczba monocytów po podaniu AMPH (SAL+AMPH) była o 85% ( $p<0,001$ ) wyższa w porównaniu z poziomem po iniekcji SAL (SAL+SAL). Liczba monocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\beta$ -adrenergicznych (PROP+AMPH) była o 40% ( $p<0,01$ ) niższa w porównaniu z poziomem po iniekcji AMPH bez blokady  $\beta$ -adrenergicznej (SAL+AMPH). Liczba monocytów po podaniu AMPH przy blokadzie receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych (PHEN+AMPH) była o 126% ( $p<0,01$ ) wyższa w porównaniu z iniekcją PHEN (PHEN+SAL).

Szczury D i S wykazywały zróżnicowany poziom liczby monocytów. Po podaniu AMPH (SAL+AMPH) liczba monocytów u szczurów D była o 32% ( $p<0,05$ ) niższa w porównaniu z S.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Otrzymane wyniki wskazują, że podawanie AMPH prowadzi do efektów immunosupresyjnych – obniżenia liczby limfocytów (oraz wyraźnej tendencji do leukopenii) we krwi obwodowej, którym towarzyszą efekty immunostymulacyjne – granulocytoza i monocytoza.

Efekt leukopenii obserwowali również Freire-Garabal i współpracownicy [5] oraz Pacifici i współpracownicy [9, 10] po jednorazowej lub wielokrotnych iniekcjach AMPH lub jej pochodnych. Obniżenie liczby leukocytów może być spowodowane zmianami w proporcjach populacji leukocytów. U szczurów dominującą populacją leukocytów są limfocyty. Obniżenie liczby limfocytów zaobserwowali Freire-Garabal i współpracownicy [5] po jednorazowym podaniu AMPH u myszy. Podobne wyniki uzyskano podając MDMA ludziom i szczurom [2, 9]. Stwierdzono również, że osoby chronicznie przyjmujące MDMA mają znacznie obniżoną liczbę limfocytów we krwi obwodowej [10]. W niniejszej pracy po podaniu AMPH także dochodziło do znacznej limfopenii.

Obserwowany w niniejszej pracy wzrost liczby granulocytów znajduje potwierdzenie w badaniach innych autorów. W pracy Wrony i współpracowników [15] po 30 minutach od iniekcji AMPH liczba granulocytów ulegała znacznemu podwyższeniu. Także jednorazowe podanie MDMA wywoływało wzrost liczby neutrofilów (granulocytów obojętnochłonnych) u szczurów [2]. Trudno znaleźć potwierdzenia w piśmiennictwie obserwowanej w niniejszej pracy monocytocytozy. Badania Connora i współpracowników [2] dowodzą, że stosowanie jednorazowej iniekcji pochodnych AMPH, MDMA i fenfluraminy, nie ma wpływu na zmianę liczby komórek tej populacji leukocytów. Jest to sprzeczne z uzyskanymi w tej pracy wynikami.

Do tej pory pozostaje nieznanym mechanizm oddziaływania AMPH na układ odpornościowy. Może to być wpływ bezpośredni na komórki immunokompetentne, jak i pośredni poprzez modulację aktywności ośrodkowych układów neurohormonalnych, w tym osi PWN i PPN. Adrenalina i noradrenalina – hormony uwalniane w wyniku aktywacji osi PWN – działają na komórki za pośrednictwem receptorów  $\alpha$ - bądź  $\beta$ -adrenergicznych.

W niniejszej pracy AMPH wykazywała tendencję do obniżania liczby leukocytów. Pod wpływem blokady  $\alpha$ - oraz łącznej  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznej tendencja ta przechodziła w efekt istotny statystycznie. Wyniki te wskazują, że stymulacja receptorów adrenergicznych (głównie  $\alpha$ ) może powodować wzrost liczby leukocytów (zmniejszając „rozmiar” leukopenii indukowanej obciążeniem). Tezę tę potwierdzałyby badania Ahlborga i Ahlborga [1], w których wywoływana wysiłkiem fizycznym leukocytoza była znoszona przez blokadę receptorów adrenergicznych.

Obserwowana po podaniu AMPH limfopenia nie zależała od receptorów adrenergicznych. Wyniki te pozostają w sprzeczności z większością danych wskazujących, że stymulacja receptorów adrenergicznych prowadzi do limfocytozy we krwi obwodowej. Gader i Cash [6] po podaniu agonistów receptorów  $\beta$  obserwowali podwyższenie liczby limfocytów. Dane te znajdują potwierdzenie w kolejnych badaniach, w których podanie adrenaliny podwyższało liczbę limfocytów, natomiast blokada receptorów  $\beta$ -adrenergicznych znosiła ten efekt [7].

W przeciwieństwie do większości badanych w tej pracy parametrów, liczba granulocytów zależała od receptacji  $\alpha$ -adrenergicznej i była niezależna od receptorów  $\beta$ -adrenergicznych. Wynik taki znajduje potwierdzenie w badaniach Gader i Cash [6], w których blokada  $\beta$ -adrenergiczna nie wpływała na zmiany liczby granulocytów. Z kolei obserwowana w niniejszej pracy monocytoza była wrażliwa na blokadę  $\beta$ -adrenergiczną oraz łączną  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergiczną.

Znaczna większość obserwowanych w tej pracy odpowiedzi układu odpornościowego na AMPH wykazywała zróżnicowanie międzygrupowe – zależne od pozycji socjalnej osobnika. U obu grup zwierząt w wyniku podania AMPH doszło do limfopenii, jednak była ona bardziej zaznaczona u szczurów S. Podobnie granulocytoza, mimo iż widoczna w obu grupach, była większa u szczurów S. Dane z piśmiennictwa wydają się potwierdzać obraz zróżnicowania reaktywności układu odpornościowego u szczurów D i S. Stefanski i Engler [12] zaobserwowali większe obniżenie liczby limfocytów u szczurów S w porównaniu z D w odpowiedzi na konfrontację socjalną. Badania Englera i współpracowników [4] potwierdzają te wyniki, gdyż obserwowali oni większą limfopenię u szczurów S. Wyniki pracy zespołu Englera [4] wskazują, podobnie jak wyniki uzyskane w tej pracy, na brak zależności limfopenii od stymulacji receptorów adrenergicznych.

Obserwowane w tej pracy zróżnicowanie granulocytozy znajduje pewne potwierdzenie w literaturze. Z pracy Stefanskiego i Englera [12] wynika, że większy wzrost liczby granulocytów występuje u zwierząt S. W niniejszej pracy monocytozę obserwowano tylko u zwierząt S. Potwierdzenia takich wyników można szukać w pracach, w których u pogryzionych zwierząt S dochodziło do większego wzrostu liczby monocytów w porównaniu z niepogryzionymi osobnikami S [13].

Biorąc pod uwagę, że osobniki D charakteryzują się znacznie silniejszą niż S aktywacją sympatyczną w odpowiedzi na obciążenie [8] oraz zależność zmian liczby leukocytów od stymulacji receptorów adrenergicznych można wysnuć wniosek, że odmienna odpowiedź u zwierząt D i S może wynikać z różnego poziomu uwalnianych pod wpływem AMPH katecholamin – adrenaliny i noradrenaliny. Kolejnym wytłumaczeniem odmiennej liczby komórek poszczególnych populacji leukocytów u osobników D i S może być większe zagęszczenie

receptorów adrenergicznych u zwierząt S w porównaniu z D. Hipotezy te wymagają jednak weryfikacji i potwierdzenia w dalszych badaniach.

## WNIOSKI

Podanie AMPH może wywoływać limfopenię, granulocytozę i monocytozę we krwi obwodowej, przy czym szczury S wykazują silniejszą reaktywność badanych parametrów układu odpornościowego na AMPH. Wydaje się, że wywołane przez AMPH zmiany w obrazie białokrwinkowym, jak również zróżnicowanie międzygrupowe tych zmian wykazują częściową zależność od receptji adrenergicznej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Ahlborg B., Ahlborg G.: Exercise leukocytosis with and without beta-adrenergic blockade. *Acta Med. Scand.* 1970, 187, 4, 241. – 2. Connor T.J., Kelly J.P., Leonard B.E.: An assessment of the acute effects of the serotonin releasers methylenedioxymethamphetamine, methylenedioxyamphetamine and fenfluramine on immunity in rats. *Immunopharmacology* 2000, 46, 3, 223. – 3. Elenkov I.J., Wilder R.L., Chrousos G.P., Vizi E.S.: The sympathetic nerve - an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52, 4, 595. – 4. Engler H., Bailey M.T., Engler A., Sheridan J.F.: Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. *J. Neuroimmunol.* 2004, 148, 1/2, 106. – 5. Freire-Garabal M., Balboa J.L., Nunez M.J., Castano M.T., Llovo J.B., Fernandez-Rial J.C., Belmonte A.: Effects of amphetamine on T-cell immune response in mice. *Life Sci.* 1991, 49, 16, PL107. – 6. Gader A.M., Cash J.D.: The effect of adrenaline, noradrenaline, isoprenaline and salbutamol on the resting levels of white blood cells in man. *Scand. J. Haematol.* 1975, 14, 1, 5. – 7. Harris T.J., Waltman T.J., Carter S.M., Maisel A.S.: Effect of prolonged catecholamine infusion on immunoregulatory function: implications in congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995, 26, 1, 102. – 8. Koolhaas J.M., Korte S.M., De Boer S.F., Van Der Veegt B.J., Van Reenen C.G., Hopster H., De Jong I.C., Ruis M.A.W., Blokhuis H.J.: Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999, 23, 7, 925. – 9. Pacifici R., Zuccaro P., Farre M., Pichini S., Di Carlo S., Roset P.N., Ortuno J., Segura J., de la Torre R.: Immunomodulating properties of MDMA alone and in combination with alcohol: a pilot study. *Life Sci.* 1999, 65, 26, PL309. – 10. Pacifici R., Zuccaro P., Farre M., Pichini S., Di Carlo S., Roset P.N., Palmi I., Ortuno J., Menoyo E., Segura J., de la Torre R.: Cell-mediated immune response in MDMA users after repeated dose administration: studies in controlled versus noncontrolled settings. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002, 965, 421.
11. Seiden L.S., Sabol K.E., Ricaurte G.A.: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993, 33, 639. – 12. Stefanski V., Engler H.: Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. *Physiol. Behav.* 1998, 64, 5, 733. – 13. Stefanski V., Engler H.: Social stress, dominance and blood cellular immunity. *J. Neuroimmunol.* 1999, 94, 1/2, 144. – 14. Tidey J.W., Miczek K.A.: Acquisition of cocaine self-administration after social stress: role of accumbens dopamine. *Psychopharmacology (Berl.)*, 1997, 130, 3, 203. – 15. Wrona D., Sukiennik L., Jurkowski M.K., Jurkowlaniec E., Glac W., Tokarski J.: Effects of amphetamine on NK-related cytotoxicity in rats differing in locomotor reactivity and social position. *Brain Behav. Immun.* 2005, 19, 1, 69.

H. Ćwikałowska, W. Glac

THE EFFECT OF AMPHETAMINE ON LEUKOCYTE POPULATIONS  
IN THE PERIPHERAL BLOOD UNDER A- AND B-ADRENERGIC BLOCKADE  
IN RATS DIFFERING IN SOCIAL POSITION

Summary

**Aim:** The purpose of the study was to assess the role of adrenergic receptors in AMPH-induced changes in leukocyte populations in rats differing in social position.

**Methods:** In rats divided on the basis of the social interactions tests into dominants (D) and submissives (S) the effects of the acute injection of AMPH (in a dose of 1 mg/kg) preceded by administration of  $\alpha$ -adrenergic receptors antagonist – phentolamine (PHEN; 5 mg/kg),  $\beta$ -adrenergic receptors antagonist – propranolol (PROP; 5 mg/kg) or the combined administration of PHEN and PROP on leukocytes populations in the peripheral blood were evaluated.

**Main results:** Acute AMPH injection tended to cause leukopenia, which reached the statistical significance under  $\alpha$ -adrenergic blockade (and combined blockade of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors). AMPH lead to lymphopenia, which was stronger in S rats. This effect was not dependent on adrenergic receptors. AMPH-induced granulocytosis as well as intergroup differences in granulocytosis (the effect stronger in S rats) depended on  $\alpha$ -adrenergic receptors. AMPH evoked monocytosis only in S rats. This effect depended on  $\beta$ -adrenergic receptors.

**Conclusions:** Administration of AMPH can evoke lymphopenia, granulocytosis and monocytosis, however S rats show stronger reactivity of examined parameters of the immune system to AMPH in comparison to D rats. It seems that AMPH-induced changes in leukocyte populations, as well as their intergroup differences are partially dependent on adrenergic receptors.

Adres: mgr Hanna Ćwikałowska  
Katedra i Zakład Fizjologii GUMed  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk  
tel. 58 349 15 20, fax: 58 349 15 21  
e-mail: hanna.cwikalowska@gumed.edu.pl