

KATARZYNA CZERWIEC¹, DOROTA MYŚLIŃSKA¹, AGNIESZKA WĄDOŁOWSKA¹,
JAN RUCIŃSKI¹, MAGDALENA PODLACHA¹, ADAM KOSIŃSKI²,
MAREK GRZYBIAK²

WPLYW TESTU OTWARTEGO POLA JAKO SPONTANICZNEJ REAKCJI BEHAVIORALNEJ NA POZIOM IL-6

THE EFFECTS OF OPEN FIELD TEST AS A SPONTANEOUS BEHAVIORAL RESPONSE TO IL-6 LEVEL

¹Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka Uniwersytetu Gdańskiego
kierownik: dr hab. Edyta Jurkowlaniec-Kopeć, prof. UG

²Zakład Anatomii Klinicznej Katedry Anatomii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
kierownik: prof. dr. hab. Marek Grzybiak

Wiele badań wskazuje, że różnorodne psychologiczne stresory mogą indukować wydzielanie cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF-alfa). To może przejawiać się cytokinezą i jest zależne od typu stresu. Badania polegające na immobilizacji zwierząt powodują podwyższenie trzech cytokin prozapalnych, podczas gdy tylko izolacja lub test otwartego pola wywołuje wzrost poziomu IL-6 we krwi. Artykuł ten ma na celu przedstawić analizę testu otwartego pola jako jeden z najbardziej popularnych modeli doświadczalnych oraz plejotropowy charakter IL-6.

Głównym wskaźnikiem, który różnicuje typy behawioralne szczurów w stosowanych aktualnie w modelach doświadczalnych, jest aktywność motoryczna w nowym otoczeniu mierzona między innymi przy użyciu testu otwartego pola. Jest to jeden z modeli doświadczalnych, który zajmuje się oceną spontanicznego behawioru, gdzie monitoruje się zachowanie gryzoni w odpowiednio zaaranżowanym otoczeniu, a analiza obejmuje ogólny profil zachowania się zwierzęcia, a nie skupia się na wykonywaniu pojedynczej czynności. Test otwartego pola po raz pierwszy został opisany przez Hall'a i Ballachey'a w 1932 roku jako metoda oceny spontanicznej reakcji behawioralnej zwierząt w nowym otoczeniu. Test ten jest wykorzystywany do testowania nowych leków, które mogą wywierać wpływ na zachowanie.

Test otwartego pola stwarza warunki nowości środowiska. Przede wszystkim jest wykorzystywany do badania poziomu stresowrażliwości, zwłaszcza na bodźce neurogenne, oraz do wywołania reakcji stresowej o charakterze emocjonalnym. Test otwartego pola określa nie tylko aktywność lokomotoryczną oraz stopień eksploracji w nowym otoczeniu, ale również

poziom lęku wobec czynnika stresującego (o charakterze neurogennym), jakim jest otwarta przestrzeń. Stosowany jest również jako test niepokoju w ocenie reaktywności na reakcję stresową. Ten test behawioralny może wywoływać depresję behawioralną. Dzięki temu jest wykorzystywany w badaniach zwierzęcych modeli niepokoju i depresji [10], a także u zwierząt transgenicznych [2].

Ekspozycja na test otwartego, jasno oświetlonego pola powoduje zwiększoną produkcję hormonów stresowych: kortykosteronu, hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) oraz prolaktyny, reniny [5]. Może również prowadzić do hipertermii spowodowanej stresem, która charakteryzuje się wzrostem temperatury ciała o około 1,5°C w porównaniu ze zwierzętami z klatek hodowlanych [3].

Podczas wykonywania eksperymentu badane są takie wskaźniki jak:

- aktywność eksploracyjna – jest to ogólna lokomocja mierzona liczbą przekroczonych kwadratów,
- wspinanie się (*rearing*) – jest to liczba epizodów stawiania na tylnych łapkach i pionizacji ciała,
- czyszczenie ciała (*grooming*) – jest to liczba epizodów czyszczenia sierści oraz mycia pyszczka,
- zneruchomienie (*freezing*) – jest to wyrażony w minutach czas trwania w bezruchu,
- defekacja – jest to liczba epizodów defekacji,
- mikcja – jest to liczba epizodów mikcji.

Test otwartego pola przeprowadza się w boksach wykonanych z białej laminowanej płyty, której wymiary wynoszą: 100×100×60 cm, których podłoga została podzielona na 25 równych kwadratów. Nad każdym z boksów można umiejscowić źródło światła – żarówkę 200 W. Badania należy przeprowadzać o stałej porze, między godziną 8:00 a 12:00.

Aby wykonać test najpierw trzeba przenieść zwierzęta do pomieszczenia, w którym będą odbywały się eksperymenty, w klatkach hodowlanych. Następnie gryzonie są umieszczane w otwartym polu zawsze w tej samej pozycji, przykładowo: przodem do jednego z rogów. Zachowanie szczurów jest monitorowane przez 20 minut. Dwaj obserwatorzy, którzy zawsze znajdują się w tych samych miejscach, zapisują obserwowane zachowania zwierząt na etogramach [12].

Interleukina 6 cechuje się wielokierunkowością oddziaływań, jest uznana za jeden z głównych czynników regulujących mechanizmy obronne. IL-6 ma za zadanie brać udział w regulacji odpowiedzi przeciwzakaźnej, reakcji ostrej fazy oraz krwiotworzeniu [16]. Produkowana jest przez monocyty oraz makrofagi, a czynnikiem indukującym jej wytwarzanie jest przede wszystkim IL-1, interferony, TNF-alfa, LPS i wirusy. IL-6 działając na limfocyty B, stymuluje końcowe ich różnicowanie w kierunku komórek uwalniających immunoglobuliny różnych klas. Ponadto wykazuje działanie na limfocyty B, które zostały już pobudzone np. przez IL-4, czy IL-5 [16]. Wraz z IL-1 beta, IL-6 bierze udział w aktywacji limfocytów T rozpoznających antygen, obok IL-1 beta, TNF-alfa i interferonów stanowi czynnik, który podwyższa temperaturę ciała. IL-6 może także odpowiadać za powstanie niektórych stanów patologicznych i chorób. Cytokina ta bierze również udział w patogenezie proliferacyjnego kłębkowego zapalenia nerek. Podwyższenie stężenia IL-6 w surowicy i w płynie maziowym torebek stawowych może przyczyniać się do powstania reumatoidalnego zapalenia stawów [16].

IL-6 stanowi czynnik wzrostowy dla limfocytów B oraz autokrynowy, jak i parakrynowy czynnik wzrostu dla niektórych szpiczaków ludzkich. Podczas przeprowadzania pierwszych prób klinicznych dowiedziono, że przeciwciała skierowane przeciwko IL-6 hamowały proli-

ferację komórek szpiczaka *in vivo*, a toksyny połączone z IL-6 były selektywnie toksyczne dla tych komórek [16]. Ponadto, w przypadku niektórych nowotworów litych, IL-6 była auto- i parakrynowym czynnikiem wzrostu komórek np. raka pęcherza, raka gruczołu krokowego, czerniaka oraz raka sutka [16]. IL-6 została odkryta po raz pierwszy jako białko stymulujące różnicowanie komórek B [16]. Dziś jest już wiadome, że IL-6 stymuluje duży zakres biologicznych funkcji w różnorodnej liczbie mięśni i komórek [16].

Stymulacja prozapalna może prowadzić do aktywacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA). Odpowiedź prozapalna jest najbardziej prymitywnym z mechanizmów obronnych. Jego podstawy istniały przed rozwojem układu nerwowego [11]. Odpowiedź stresowa ewoluowała i jest ściśle powiązana z odpowiedzią zapalną. Ważnym stymulatorem zapalenia jest lipopolisacharyd (LPS), który jest zawarty w ścianie komórkowej bakterii Gram ujemnych. Pobudza on oś HPA do produkcji kortykoliberyny (CRF). Pomimo że odpowiedź stresowa jest aktywowana przez te bodźce, to powstałe psychologiczne zmiany również wyposażają organizm do walki z infekcją [1]. Kortykosteroidy i katecholaminy, główne hormony stresu, również biorą udział w powstaniu odpowiedzi odznaczającej się produkcją cytokin oraz substratów ostrej fazy jako stanu zapalnego. Odpowiedź zapalna jest bardzo podobna do odpowiedzi stresowej, która jest pobudzana przez bodźce psychogenne. To sprzężenie jest zaletą, która pozwala zwierzęciu na przeżycie bądź powrót do zdrowia. Układ immunologiczny ewoluował z układu przeciwapalnego i jest ściśle zaangażowany w ochronę gospodarza. Połączone jest to również z odpowiedzią stresową [1].

Stres psychologiczny wpływa na różnorodne funkcje: behawioralne, endokrynowe, autonomiczne i immunologiczne. Odpowiedź na stres psychologiczny przypomina reakcję ostrej fazy, która jest wywoływana przez infekcje bądź zapalenie [4]. Hipertermia w związku ze stresem psychologicznym jest ściśle konserwatywną cechą. Dla przykładu: radzenie sobie ze stresem bądź ekspozycja na nowe środowisko u szczurów może spowodować podwyższenie temperatury rdzenia aż o 2°C. Hipertermia wywołana stresem jest integralną częścią odpowiedzi organizmu na sytuacje postrzegane jako niepokojące i mogące służyć aktywowaniu odpowiedzi immunologicznej [4]. Podczas sepsy i lokalnego zapalenia, IL-6 jest uważana za powszechny mediator podczas kaskady cytokin prowadzącej do fibrogenyzy [4]. W badaniach jest dobrze udokumentowany wzrost stężenia IL-6 w osoczu podczas stresu. Te wyniki mogą sugerować, że IL-6 może uczestniczyć w podwyższeniu temperatury podczas wystąpienia reakcji stresowej. IL-6 nie tylko oddziałuje na regulację temperatury ciała, ale również wywiera wpływ na różnorodne behawioralne efekty, włączając anoreksję. Niemniej jednak znaczenie endogennej IL-6 w zachowaniu emocjonalnym podczas psychologicznego stresu nie jest jeszcze do końca poznane [4].

W badaniach przeprowadzonych przez zespół LeMay [7] sprawdzano wpływ psychologicznego stresu wyrażonego aktywnością IL-6 w osoczu szczurów. Do eksperymentu użyto 46 szczurów, które poddano testowi otwartego pola. W badaniu przeprowadzono również pomiar temperatury ciała. Aktywność IL-6 w osoczu była mierzona za pomocą linii komórek hybrydomy B-9 zależnych od IL-6 (jest to hybrydoma powstała po fuzji komórek mysiej śledziony z komórkami szpiczaka, ta linia komórkowa potrzebuje do wzrostu IL-6, stąd wykorzystuje ją się do oznaczeń jej aktywności biologicznej). Wyniki eksperymentu wykazały znaczący wzrost stężenia IL-6 w osoczu szczurów po wykonaniu testu otwartego pola po 15, 30 i 60 minutach. Badania dowiodły, że stres psychiczny spowodowany przez umieszczenie zwierzęcia w otwartym polu, skutkowało podwyższeniem poziomu IL-6 w osoczu. Brak bodźca fizycznego może zwiększyć wydzielanie cytokin – jest to ważne dla odporności swoistej i nieswoistej [7].

W badaniach nad zależnościami pomiędzy aktywnością IL-6, białkami ostrej fazy i zaangażowaniem osi podwzgórze-prysadka-nadnercza w ciężkiej depresji starano się zbadać, czy ciężka depresja cechuje się zwiększoną aktywnością IL-6, czy też produkcja IL-6 jest związana z zmienionymi poziomami stężeń białek ostrej fazy oraz nieprawidłowym działaniem osi HPA [9]. Badanie wykazało znaczącą korelację między stężeniem IL-6 w supernatantach a haptoglobulinami i transferynami. Istnieją dowody, że IL-1 oraz IL-6 jest odpowiedzialna za regulację syntezy białek ostrej fazy. Można postulować, że odpowiedź ostrej fazy w przebiegu depresji jest tłumaczona przez nadmierne wydzielanie interleukin w tej chorobie. Należy podkreślić, że glukokortykoidy są niezbędne do osiągnięcia maksymalnego stężenia IL-1 i IL-6, które są pobudzane przez syntezę białek ostrej fazy przez wątrobę [9].

IL-6 zawarta w osoczu może wywołać swoją produkcję w przedniej przysadce poprzez pozytywne sprzężenie. IL-6 może stymulować osi HPA w stężeniach, które występują w ludzkim osoczu. Jest to wystarczające, aby wywierać działanie na komórki układu odpornościowego. Nie jest to prawdopodobne, żeby nadaktywność osi HPA była związana ze wzmoczoną produkcją IL-6 u pacjentów zmagających się z ciężką depresją. Glukokortykoidy mogą zahamować produkcję IL-6 w monocytach poprzez uniemożliwienie transkrypcji genów IL-6 [9].

Badania sugerują, że psychologiczny stres, rzadziej niż kombinacja psychologicznego i fizycznego stresu, może powodować wzrost poziomu IL-6 [8]. Zauważono również, że ostremu psychologicznemu stresowi towarzyszyła znacząca korelacja pomiędzy białkiem C-reaktywnym a IL-6. To sugeruje, że wzmoczona produkcja cytokin prozapalnych takich jak IL-6 podczas reakcji stresowej może pośredniczyć we wpływie psychologicznego stresu na immunoglobuliny i białka ostrej fazy. To kolejne potwierdzenie, że cytokiny prozapalne takie jak IL-6 są głównymi modyfikatorami reakcji ostrej fazy. Są również zaangażowane w produkcję immunoglobulin A, G oraz M [8].

PIŚMIENNICTWO

1. Black P. H.: Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav. Immun.* 2002, 16, 6, 622. – 2. Bolivar V. J., Caldarone B. J., Reilly A. A., Flaherty L.: Habituation of activity in an open field: a survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav. Genet.* 2000, 30, 4, 285. – 3. Briese E., Cabanc M.: Stress hyperthermia: physiological argument that it is a fever. *Physiol Behav* 1991, 49, 6, 1153. – 4. Butterweck V., Printz S., Schwaninger M.: The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice. *Behav. Brain Res.* 2003, 144, 49, 1/2. – 5. Castanon N., Pérez-Díaz F., Mormede P.: Genetic analysis of the relationship between behavioral and neuroendocrine traits in roman high and low avoidance rat lines. *Behav. Genet.* 1995, 25, 4, 371. – 6. Hofer M. J., Campbell I. L.: Immuno-inflammatory diseases of the central nervous system – the tale of two cytokines. *Br. J. Pharmacol.* 2016, 173, 4, 176. – 7. LeMay L. G., Vander A. J., Kluger M. J.: The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats, *Physiol. & Behav.* 1990, 47, 5, 957. – 8. Maes M., Hendriks D., Van Gastel A., Demedts P., Wauters A., Neels H., Janca A., Scharpé S.: Effects of psychological stress on serum immunoglobulin, complement and acute phase protein concentrations in normal volunteers. *Psychoneuroendocrinology* 1997, 6, 397. – 9. Maes M., Scharpé S., Meltzer H. Y., Bosmans E., Suy E., Calabrese J., Cosyns P.: Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatry Res.* 1993, 49, 1, 11. – 10. Meerlo P., Overkamp G. J., Benning M. A., Koolhaas J. M., Van den Hoofdakker R. H. Long-term changes in open field behaviour following a single social defeat in rats can be reserved by sleep deprivation. *Physiol. Behav.* 1996, 60, 1, 115.

11. Reichlin S.: Neuroendocrinology of infection and the innate immune system. *Recent Prog. Horm. Res.* 1999, 54, 133. – 12. Wrona D., Klejbor I., Trojnar W.: Chronic electric stimulation of the midbrain ventral tegmental area increases spleen but not blood natural killer cell cytotoxicity in rats. *J. Neuroimmunol.* 2004, 155, 1/2, 85.

K. Czerwiec, D. Myślińska, A. Wądołowska, J. Ruciński, M. Podlaha, A. Kosiński, M. Grzybiak

THE EFFECTS OF OPEN FIELD TEST AS A SPONTANEOUS BEHAVIORAL RESPONSE TO IL-6 LEVEL

Summary

Many studies have shown that a variety of psychological stressors may induce release of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF-alpha) (Dhabhar et al. 1996). This can be manifested in cytokines, and may depend on the type of stress. Studies involving the immobilization of animals cause the increase in the three proinflammatory cytokines, whereas only isolation and open-field test induce an increase in IL-6 levels in the blood. The article aims to provide an analysis of the open field test as one of the most popular models of experimental and pleiotropic nature of IL-6.

Adres: mgr Katarzyna Czerwiec
e-mail: kasia0001@poczta.onet.pl