

# Substancja P w jądrze konarowo-mostowym nakrywki a hipokampalny rytm *theta*

## Substance P in the pedunculo-pontine tegmental nucleus and hippocampal theta rhythm

Emilia Leszkowicz, Weronika Trojnar

Katedra Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Gdańskiego

### ■ Abstract

#### Substance P and hippocampal theta rhythm

**Introduction.** *The theta rhythm — synchronous hippocampal activity recorded during REM sleep and in waking during increased vigilance and learning — is regulated by the brainstem reticular structures, including the pedunculo-pontine tegmental nucleus (PPN). The study was aimed at the involvement of Substance P (SP), a neuromodulatory peptide present in the PPN, in the regulation of the theta rhythm.*

**Material and methods.** *The effect of the unilateral injection of SP (5 µg/0.5 ml) directly into the PPN on the theta rhythm induced by sensory stimulation (pinch tail) was studied in urethane-anesthetized rats. Peak power and the corresponding peak frequency were analyzed in two frequency bands: theta (3.1–6 Hz) and delta (1–3 Hz), before and after SP injection.*

**Results.** *Intra-PPN administration of SP blocked the theta rhythm and augmented delta activity. Theta peak power dropped to  $53.0 \pm 5.3\%$  of the preinjection baseline in the hippocampus ipsilateral and to  $46.3 \pm 5.6\%$  in the hippocampus contralateral to the injection 10 min following SP. At the same time delta peak power raised to  $398.9 \pm 50.5\%$  and  $594.7 \pm 67.2\%$ , respectively. Suppression of the theta persisted over 60 min, while increased delta activity lasted 20 min. SP administration did not change peak frequency in the studied bands.*

**Conclusions.** *1. Obtained results indicate that tachykinin receptors, which so far have not been detected in the PPN, are present in this nucleus. 2. Substance P in the PPN has suppressive contribution in the regulation of the hippocampal theta rhythm.*

**Key words:** EEG, neuromodulation, tachykinin system, theta rhythm regulation

#### Adres do korespondencji:

Emilia Leszkowicz  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Uniwersytetu Gdańskiego  
ul. Kładki 24  
80-822 Gdańsk  
tel.: (0 58) 301 94 34  
faks: (0 58) 301 40 85  
e-mail: eremita@biotech.univ.gda.pl

### ■ Wstęp

Charakterystyczną cechą zapisu EEG podczas fazy snu REM jest obecność synchronicznych fal *theta*, których zakres częstotliwości u człowieka wynosi 4–7 Hz, a u gryzoni — 3–12 Hz. Do niedawna aktywność tę u ludzi rejestrowano prawie wyłącznie z powierzchni kory, ale ostatnio stwierdzono obecność synchronicznych fal *theta* także w hipokampie [1], który — jak dotąd — pozostaje głównym miejscem badania rytmu *theta* u zwierząt [np. 2–4]. Fale *theta* towarzyszą też procesom uczenia się u człowieka [5, 6] i zwierząt [7].

Trwa spór o znaczenie snu w procesach konsolidacji pamięci [8]. Niektórzy autorzy podkreślają jego znaczenie [9, 10], inni mu zaprzeczają [11], jeszcze inni zaś starają się sprecyzować, które elementy snu w sposób decydujący uczestniczą w mechanizmach uczenia się [12]. Istnieją dane wskazujące, że dla procesów pamięciowych istotna jest aktywność hipokampa w zakresie częstotliwości fal *theta* podczas fazy REM [13]. Dlatego też zrozumienie mechanizmów indukcji rytmu *theta* jest ciekawe i obiecujące, nie tylko z czysto poznawczego, ale i aplikacyjnego punktu widzenia.

Przedmiotem niniejszej pracy jest istotne ogniwo łańcucha generującego i regulującego rytm *theta* — jądro konarowo-mostowe nakrywki (PPN, *pedunculopontine tegmental nucleus*), leżące w okolicy skrzyżowania górnych konarów mózdzku, którego aktywacja indukuje [14, 15], natomiast dezaktywacja blokuje rytm *theta* [16]. W dotychczasowych badaniach potwierdzono udział neuronów cholinergicznym, GABA-ergicznym i glutaminergicznym jądra PPN w kontroli hipokampalnego rytmu *theta* [14, 15, 17]. Struktura ta zawiera również wiele peptydów neuromodulujących, w tym tak zwaną substancję P (SP) [18, 19] — neuropeptyd o działaniu depolaryzującym [20, 21], wykazujący powinowactwo do receptorów tachykininowych, a zwłaszcza receptora NK1 [22]. Wykazano udział SP w procesach indukcji snu u człowieka (również fazy REM [23]), a także w regulacji rytmu *theta* u królika [24, 25]. Dane te skłoniły autorów niniejszej pracy do próby wyjaśnienia, jaki jest udział SP jądra PPN w regulacji rytmu *theta*.

## ■ Materiał i metody

Doświadczenia przeprowadzono na 11 szczurach, samcach szczepu *Wistar*, którym po podaniu narkozy uretanowej (1,2–1,6 g/kg *i.p.*) implantowano obustronnie elektrody rejestracyjne do hipokampa oraz elektrodę odniesienia i uziemienia nad opuszką węchową. Nad PPN nawiercano otwór do późniejszego wprowadzenia kaniuli iniekcyjnej, przez którą podawano SP. Miejsca implantacji elektrod rejestracyjnych oraz kaniuli określano na podstawie atlasu mózgu szczura *Paxinosa* i *Watsona* [26].

Podczas ciągłej rejestracji hipokampalnego EEG (za pomocą elektroencefalografu firmy Medikor i oprogramowania *EEG-DigiTrack* firmy Elmiko) zwierzęta pozostawały pod narkozą. Rytm *theta* wywoływano stymulacją sensoryczną, zaciskając klamerkę (przez 1 min) na ogonie zwierzęcia. Zwierzętom podawano jednostronnie do PPN 0,5  $\mu$ l roztworu (woda odtlenowana lub 2-procentowy kwas askorbinowy), a następnie — 5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l SP.

Stosując dyskretną transformatę Fouriera, analizowano 5-sekundowe próbki sygnału EEG. U każdego osobnika pobierano po 6–10 próbek z okresów stymulacji czuciowej przed iniekcją (norma osobnicza), po iniekcji roztworu oraz po iniekcji SP. Określano maksymalną moc sygnału EEG oraz odpowiadającą jej częstotliwość w dwóch pasmach częstotliwościowych: *theta* (3,1–6 Hz) i *delta* (1–3 Hz). Aby wyeliminować wpływ różnic międzypersonalnych, moc wyrażono w procentach normy osobniczej (% normy), a częstotliwość znormalizowano do 4 Hz. Tak uzyskane wyniki poddano jednoczynnikowej analizie wariancji z faktorem czasu (norma, 10 min po iniekcji roztworu i 10, 20, 30, 40, 50, 60 min po podaniu SP), a następnie przeprowadzono postwariancyjny test Tukey'a. Dane z obu hipokampów porównywano za pomocą testu *t*-Studenta.

Po zakończeniu doświadczeń mózgi poddano standardowej procedurze histologicznej i określono miejsce i zakres iniekcji SP.

Protokół doświadczeń zatwierdziła Lokalna Komisja Etyczna przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

## ■ Wyniki

Stymulacja czuciowa (ucisk ogona) w warunkach spoczynkowych powodowała indukcję rytmu *theta* w hipokampie obu półkul (ryc. 1, I panel). Iniekcje do PPN wody odtlenowanej lub 2-procentowego kwasu askorbinowego, które stosowano jako rozpuszczalniki SP, nie wpływały na przebieg tej reakcji (ryc. 1, II panel). Natomiast po jednostronnej iniekcji 5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l SP do PPN nastąpiła wyraźna zmiana w zapisie hipokampalnego EEG — zanik rytmu *theta* i pojawienie się fal *delta*, co wyrażało się jako spadek maksymalnej mocy sygnału w paśmie *theta* i wzrost maksymalnej mocy sygnału w paśmie *delta* (ryc. 1, III panel).

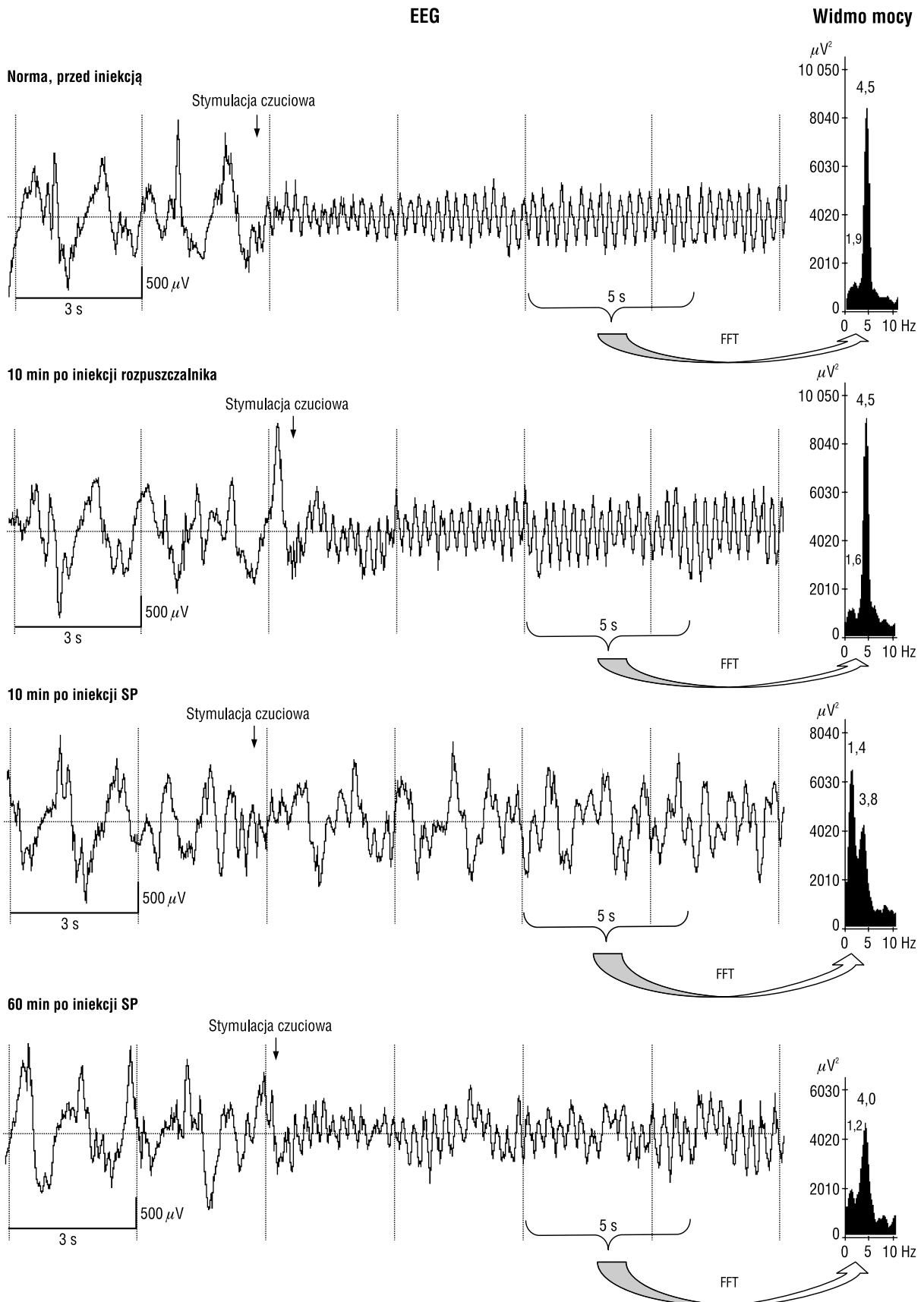
Zmniejszenie maksymalnej mocy sygnału w zakresie fal *theta* było istotne statystycznie zarówno po stronie ipsilateralnej [ $F(7,358) = 17,69$ ;  $p < 0,001$ ], jak i kontralateralnej [ $F(7,496) = 29,10$ ;  $p < 0,001$ ] do iniekcji (ryc. 2). Wzrost mocy fal *delta* również był istotny statystycznie w obu hipokampach [odpowiednio:  $F(7,365) = 9,85$ ;  $p < 0,001$  i  $F(7,505) = 8,05$ ;  $p < 0,001$ ] (ryc. 2). Supresyjny wpływ SP na rytm *theta* ujawnił się 10 minut po iniekcji, gdy maksymalna moc sygnału była obniżona do  $53,0 \pm 5,3\%$  normy (przed iniekcją) w hipokampie ipsilateralnym i do  $46,3 \pm 5,6\%$  — w kontralateralnym. Maksymalna moc sygnału w zakresie fal *delta* wzrosła w tym okresie do odpowiednio:  $398,9 \pm 50,5\%$  i  $594,7 \pm 67,2\%$  normy (ryc. 2).

Mimo stopniowego wygaszania efektu SP (ryc. 1, IV panel) istotny spadek mocy w paśmie *theta* utrzymywał się do końca rejestracji — 60 minut po podaniu SP parametr ten wynosił  $74,0 \pm 5,5\%$  normy po stronie ipsilateralnej i  $72,9 \pm 5,4\%$  — po stronie kontralateralnej. Wpływ SP na moc w paśmie *delta* był krótszy i nieistotny już po 30 minutach od iniekcji.

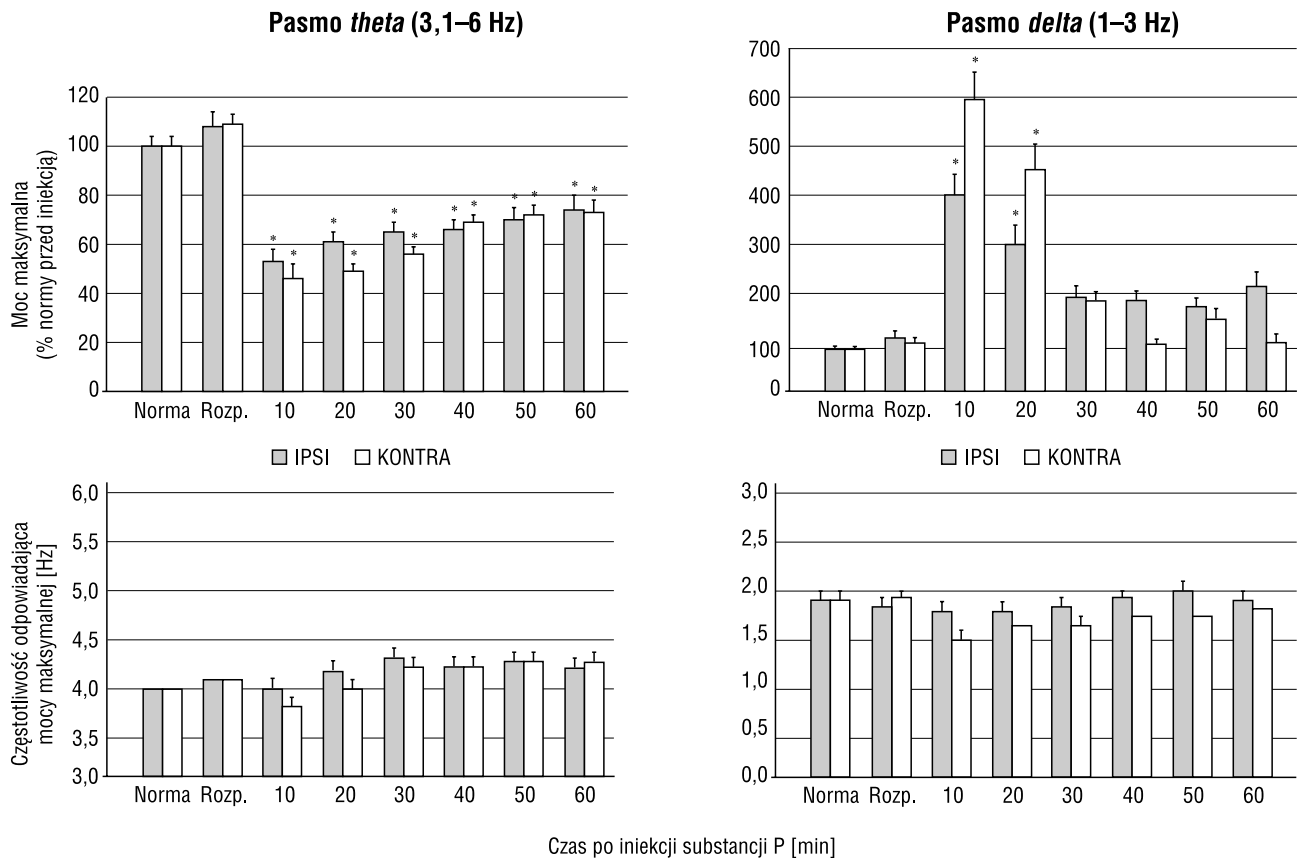
Podanie SP nie wpłynęło istotnie ani na częstotliwość rytmu *theta*, ani *delta* (ryc. 2).

Z porównań międzypółkulowych wynika, że wpływ SP na moc sygnału EEG był nieco silniejszy po stronie kontra- niż ipsilateralnej w obu pasmach. W wypadku rytmu *theta* różnica między półkulami była istotna 20 minut po iniekcji, gdy maksymalna moc sygnału zmalała do  $48,5 \pm 3,3\%$  normy w hipokampie kontra- i do  $60,7 \pm 4,4\%$  w hipokampie ipsilateralnym ( $p < 0,05$ ). W paśmie *delta* istotność różnic międzypółkulowych stwierdzono 10 minut po podaniu SP, gdy maksymalna moc sygnału EEG wzrosła do  $594,7 \pm 67,2\%$  normy po stronie kontralateralnej i do  $339,0 \pm 50,5\%$  po stronie ipsilateralnej ( $p < 0,05$ ).

Obserwowane efekty były specyficzne dla PPN i nie występowały w wypadku iniekcji do struktur sąsiadujących,

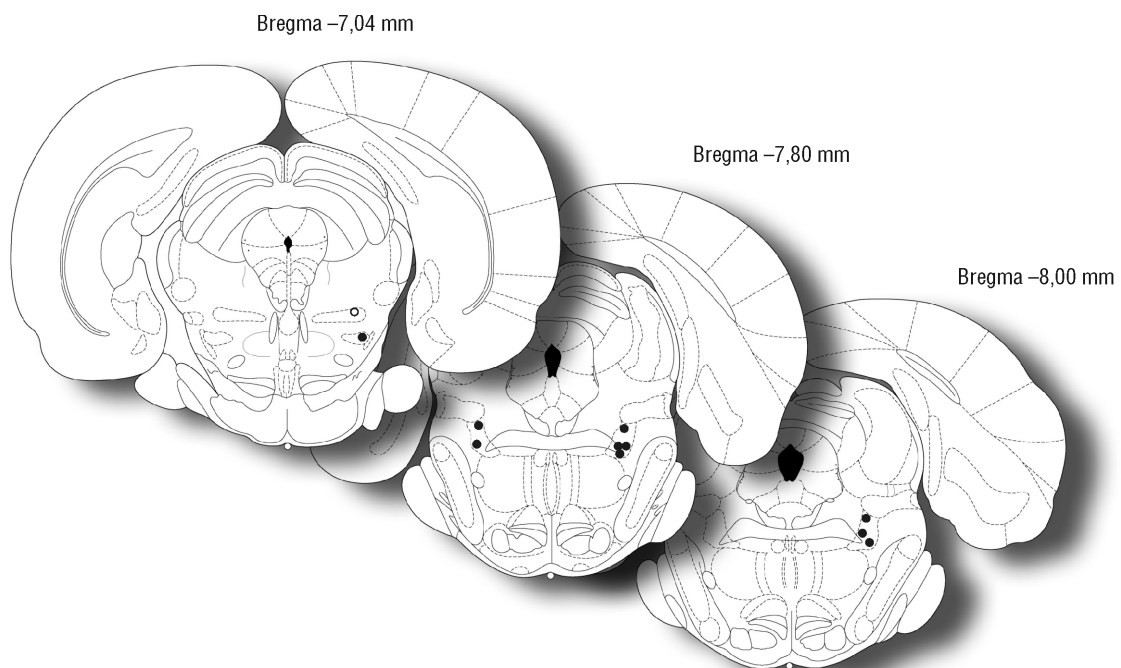


**Rycina 1.** Supresja hipokampalnego rytmu *theta* wywołanego stymulacją czuciową po jednostronnej iniekcji substancji P (SP) do jądra konarowo-mostowego nakrywki (przykładowy szczur poddany narkozie uretanowej; hipokamp ipsilateralny do iniekcji); FFT (*fast Fourier transform*) — szybka transformata Fouriera



Czas po iniekcji substancji P [min]

**Rycina 2.** Obustronne zmniejszenie mocy sygnału EEG w paśmie *theta* (3,1–6 Hz), wzrost mocy w paśmie *delta* (1–3 Hz) oraz brak zmian częstotliwości po jednostronnej iniekcji substancji P do jądra konarowo-mostowego nakrywki. Wyniki przedstawiono w postaci średnich ± SE; \**p* < 0,05 w porównaniu zarówno do normy przed iniekcją, jak i do wartości po podaniu rozpuszczalnika; IPSI — hipokamp ipsilateralny do iniekcji (n = 6); KONTRA — hipokamp kontralateralny do iniekcji (n = 8)



**Rycina 3.** Lokalizacja kaniul iniekcyjnych naniesiona na przekroje z atlasu mózgu szczura Paxinosa i Watsona (1986); ● lokalizacja w jądrze konarowo-mostowym nakrywki; ○ lokalizacja jądrze konarowo-mostowym nakrywki

takich jak pole pozaczerwienne (*area retrorubralis*). Na rycinie 3 przedstawiono lokalizację efektywnych kaniul iniekcyjnych w PPN i nieefektywnej kaniuli, zlokalizowanej poza PPN.

## ■ Dyskusja

Substancja P jest neuromodulatorem o działaniu depolaryzującym [20, 21] i oddziałuje poprzez receptory tachykininowe NK, wykazując najwyższe powinowactwo do receptorów NK1 [22]. Obecność receptorów NK1 w mózgu szczurów stwierdzono na neuronach cholinergicznym [27], glutaminergicznym i GABA-ergicznym [28]. Ponieważ wszystkie trzy typy komórek znajdują się w PPN, wydaje się prawdopodobne, że SP w PPN aktywuje zarówno czynność cholinergiczną tego jądra (dodatnio sprzężoną z rytmem *theta*), jak i jego aktywność GABA- i glutaminergiczną (ujemnie skorelowane z tym rytmem). Trzeba jednak nadmienić, że do tej pory nie wykryto obecności receptorów tachykininowych w PPN. Ponadto, endogenna SP obecna zarówno w komórkach cholinergicznym [18], jak i w niecholinergicznym PPN [19] i uwalniana na zasadzie kotransmisji może dodat-

kowo wpływać na działanie postsynaptyczne głównych transmiterów. Mimo że trudno zidentyfikować sieć wewnętrznych neuronalnych połączeń w PPN, poprzez które działa SP, to efekt tego działania jest jednoznaczny — hamowanie rytmu *theta* i wzbudzenie aktywności *delta*.

Z tego punktu widzenia interesujące są prace Kosińskiego i wsp. [24, 25], w których SP podana do komórki mózgu królików torowała hipokampalny rytm *theta*. Gdyby pominąć różnice gatunkowe jako ewentualnie odpowiedzialne za ten odmienny od uzyskanego w niniejszej pracy wynik, można sądzić, że wpływ SP na rytm *theta* zależy od specyfiki obwodu neuronalnego, w którym działa ten neuromodulator. Na poziomie PPN jest to wpływ supresyjny.

## ■ Wnioski

1. Otrzymane wyniki wskazują na obecność receptorów tachykininowych na neuronach jądra konarowo-mostowego nakrywki mózgu szczura.
2. Substancja P w jądrze konarowo-mostowym nakrywki ma supresyjny udział w regulacji hipokampalnego rytmu *theta*.

## ■ Streszczenie

### Substancja P i hipokampalny rytm *theta*

**Wstęp.** Rytm *theta* — synchroniczna aktywność hipokampa rejestrowana podczas fazy snu REM, a w czasie czuwania pojawiająca się w stanach wzmożonej uwagi i w trakcie uczenia się — regulują struktury pnia mózgu, m.in. jądro konarowo-mostowe nakrywki (PPN). Celem niniejszej pracy było zbadanie udziału substancji P (SP) — jednego z peptydów neuromodulatorowych obecnych w PPN — w regulacji rytmu *theta*.

**Materiał i metody.** Na modelu szczurów poddanych narkozie uretanowej badano wpływ jednostronnego podania SP (5 µg/0,5 µl) bezpośrednio do PPN na rytm *theta* indukowany stymulacją sensoryczną (ucisk ogona). Analizowano maksymalną moc i odpowiadającą jej częstotliwość w dwóch zakresach częstotliwościowych sygnału EEG: *theta* (3,1–6 Hz) i *delta* (1–3 Hz), przed i po podaniu SP.

**Wyniki.** Domózgowa iniekcja SP powodowała blokowanie rytmu *theta* i nasilenie aktywności w paśmie *delta*. Po 10 minutach od iniekcji SP maksymalna moc sygnału EEG w paśmie *theta* zmalała do  $53,0 \pm 5,3\%$  wartości wyjściowej przed iniekcją w hipokampie ipsilateralnym i do  $46,3 \pm 5,6\%$  — w hipokampie kontralateralnym. Maksymalna moc sygnału w zakresie fal *delta* wzrosła jednocześnie do (odpowiednio)  $398,9 \pm 50,5\%$  i  $594,7 \pm 67,2\%$ . Efekt tłumienia rytmu *theta* utrzymywał się przez 60 minut, natomiast nasiloną aktywność w zakresie fal *delta* — przez 20 minut. Iniekcja SP nie wpłynęła istotnie na częstotliwość w badanych pasmach.

**Wnioski.** 1. Uzyskane wyniki wskazują na obecność nieopisanych dotąd receptorów tachykininowych w PPN. 2. Wyniki te świadczą o supresyjnym udziale substancji P jądra konarowo-mostowego nakrywki w regulacji hipokampalnego rytmu *theta*.

**Słowa kluczowe:** EEG, neuromodulacja, system tachykininowy, regulacja rytmu *theta*

## ■ Piśmiennictwo

1. Cantero J.L., Atienza M., Stickgold R., Kahana M.J., Madsen J.R., Kocsis B. Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J. Neurosci.* 2003; 23: 10 897–10 903.
2. Usui S., Iwahara S. Effects of atropine upon the hippocampal electrical activity in rats with special reference to paradoxical sleep. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1977; 42: 510–517.
3. Monmaur P., Houcine O., Delacour J. Experimental dissociation between wakefulness and paradoxical sleep hippocampal theta. *Physiol. Behav.* 1979; 23: 471–479.
4. Jiang F., Khanna S. Reticular stimulation evokes suppression of CA1 synaptic responses and generation of theta through separate mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19: 295–308.

5. Caplan J.B., Madsen J.R., Schulze-Bonhage A., Aschenbrenner-Scheibe R., Newman E.L., Kahana M.J. Human theta oscillations related to sensorimotor integration and spatial learning. *J. Neurosci.* 2003; 23: 4726–4736.
6. Tesche C.D., Karhu J. Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 919–924.
7. Yamaguchi Y., Aota Y., Sato N., Wagatsuma H., Wu Z. Synchronization of neural oscillations as a possible mechanism underlying episodic memory: a study of theta rhythm in the hippocampus. *J. Integr. Neurosci.* 2004; 3: 143–157.
8. Ficca G., Salzarulo P. What in sleep is for memory. *Sleep Med.* 2004; 5: 225–230.
9. Wetzell W., Wagner T., Balschun D. REM sleep enhancement induced by different procedures improves memory retention in rats. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 18: 2611–2617.
10. Rauchs G., Bertran F., Guillery-Girard B. i wsp. Consolidation of strictly episodic memories mainly requires rapid eye movement sleep. *Sleep* 2004; 27: 395–401.
11. Vertes R.P. Memory consolidation in sleep; dream or reality. *Neuron* 2004; 44: 135–148.
12. Datta S., Mavanji V., Ulloor J., Patterson E.H. Activation of phasic pontine-wave generator prevents rapid eye movement sleep deprivation-induced learning impairment in the rat: a mechanism for sleep-dependent plasticity. *J. Neurosci.* 2004; 24: 1416–1427.
13. Poe G.R., Nitz D.A., McNaughton B.L., Barnes C.A. Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep. *Brain Res.* 2000; 855: 176–180.
14. Vertes R.P., Colom L.V., Fortin W.J., Bland B.H. Brainstem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp. Brain Res.* 1993; 96: 419–429.
15. Kinney G.G., Vogel G.W., Feng P. Brainstem carbachol injections in the urethane anesthetized rat produce hippocampal theta rhythm and cortical desynchronization: a comparison of pedunculo-pontine tegmental versus nucleus pontis oralis injections. *Brain Res.* 1998; 809: 307–313.
16. Nowacka A., Jurkowlanec E., Trojnar W. Microinjection of procaine into the pedunculo-pontine tegmental nucleus suppresses hippocampal theta rhythm in urethane-anesthetized rats. *Brain Res. Bull.* 2002; 58: 377–384.
17. Nowacka A., Trojnar W. Influence of GABA-ergic and glutamatergic transmission in the pedunculo-pontine tegmental nucleus on hippocampal theta activity. *Eur. J. Neurosci.* 2000; 12 (supl. 11): 80.
18. Standaert D.G., Saper C.B., Rye D.B., Wainer B.H. Colocalization of atropine-like immunoreactivity with choline acetyltransferase- and substance P-like immunoreactivity in the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei in the rat. *Brain Res.* 1986; 382: 163–168.
19. Kohlmeier K.A., Burns J., Reiner P.B., Semba K. Substance P in the descending cholinergic projection to REM sleep-induction regions of the rat pontine reticular formation: anatomical and electrophysiological analyses. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 15: 176–196.
20. Adams P.R., Brown D.A., Jones S.W. Substance P inhibits the M-current in bullfrog sympathetic neurones. *Br. J. Pharmacol.* 1983; 79: 330–333.
21. Shen K.Z., North R.A. Substance P opens cation channels and closes potassium channels in rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 1992; 50: 345–353.
22. Regoli D., Drapeau G., Dion S., D'Orleans-Juste P. Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sci.* 1987; 40: 109–117.
23. Lieb K., Ahlvers K., Dancker K. i wsp. Effects of the neuropeptide substance P on sleep, mood, and neuroendocrine measures in healthy young men. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27: 1041–1049.
24. Kosinski S., Gregorowicz K., Kielczykowska E. The effect of intracerebroventricular administration of substance P fragment and met-enkephalin on the transmission of nervous impulses between the midbrain reticular formation and two generators of the hippocampal theta rhythm in rabbits. *Acta Physiol. Pol.* 1984; 35: 417–425.
25. Kosinski S., Gregorowicz K., Antkowiak K. Extinction of hippocampal theta rhythm evoked by mid-brain stimulation after intracerebroventricular administration of substance P fragment and enkephalin administration in rabbits. *Brain Res.* 1981; 222: 65–74.
26. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego 1998.
27. Pickel V.M., Douglas J., Chan J., Gamp P.D., Bunnett N.W. Neurokinin-1 receptor distribution in cholinergic neurons and targets of substance P terminals in the rat nucleus accumbens. *J. Comp. Neurol.* 2000; 423: 500–511.
28. Bailey C.P., Maubach K.A., Jones R.S. Neurokinin-1 receptors in the rat nucleus tractus solitarius: pre- and postsynaptic modulation of glutamate and GABA release. *Neuroscience* 2004; 127: 467–479.