



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii
Eksperymentalnej

Paweł Napora

**Kompensacja komunikacji
nerwowo-odpornościowej
po zahamowaniu aktywności
cyklooksygenaz**

Compensation of neuro-immune communication
after inhibition of the activity of cyclooxygenases

Praca Doktorska
wykonana w Katedrze Neurobiologii
Uniwersytetu Łódzkiego

Promotor:

- dr hab. Marek Wieczorek prof. UŁ

Łódź, 2023

Spis treści

Spis publikacji i manuskryptów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	4
Wykaz skrótów	5
1. Wprowadzenie	7
2. Cel rozprawy doktorskiej.....	11
3. Materiał i metody badawcze	13
3.1. Zwierzęta doświadczalne.....	13
3.2. Procedury doświadczalne.....	13
3.3. Techniki pomiarowe i metody	14
3.3.1. Oznaczanie stężenia monoamin i aminokwasów neurotransmisyjnych w OUN	14
3.3.2. Oznaczanie stężenia kortykosteronu w osoczu krwi.....	15
3.3.3. Oznaczanie stężenia cytokin prozapalnych w osoczu krwi	15
3.3.4. Analiza behawioralna	15
3.3.5. Analiza statystyczna	15
4. Omówienie wyników	16
4.1. Wpływ inhibitorów COX na zawartość cytokin prozapalnych w osoczu krwi zwierząt w warunkach septycznych i nieseptycznych	17
4.2. Cytokiny prozapalne	17
4.3. Kortykosteron.....	17
4.4. Wpływ długoterminowego podawania inhibitorów cyklooksygenaz na neurotransmisję monoaminergiczną w wybranych strukturach OUN szczura.....	18
4.4.1. Odpowiedź układu noradrenergicznego na długotrwałe hamowanie aktywności cyklooksygenaz.....	18
4.4.2. Reakcja układu dopaminergicznego w odpowiedzi na długotrwałe blokowanie aktywności cyklooksygenaz.....	19
4.4.3. Efekty hamowania aktywności cyklooksygenaz obserwowane w obrębie układu serotonergicznego.....	21
4.5. Wpływ długotrwałego hamowania aktywności cyklooksygenaz na zachowanie zwierząt w uniesionym labiryncie krzyżowym.....	23
4.5.1 Hamowanie aktywności szlaku COX-2/PGE2 prowadzi do zwiększonej aktywności lokomotorycznej u szczurów	23
4.5.2. Wpływ długoterminowego hamowania aktywności cyklooksygenaz na natężenie poziomu lęku oraz podejmowanie ryzyka	24
4.5.3. Preferencja miejsca jako potencjalny wskaźnik zachowań socjalnych	25
4.6. Wpływ długoterminowego podawania inhibitorów cyklooksygenaz na aktywność aminokwasowych układów neurotransmisyjnych w wybranych strukturach OUN.....	26
4.6.1. Zmiany zawartości aminokwasów w ciele migdałowatym podczas blokowania aktywności cyklooksygenaz.....	26

4.6.2. Modyfikacja zawartości aminokwasów w pniu mózgu jako efekt długotrwałego podawania inhibitorów COX.....	28
4.6.3. Profil aminokwasowy hipokampa i zaburzenie aktywności szlaku COX-1 oraz COX-2/PGE2	29
4.6.4. Wpływ długoterminowego blokowania aktywności cyklooksygenaz na zawartość aminokwasów w podwzgórzu	32
4.6.5. „Aminokwasowa odpowiedź” istoty szarej okołowodociągowej na długotrwałe hamowanie aktywności cyklooksygenaz	36
5. Wnioski	40
6. Streszczenie	43
6.1. Abstract	44
7. Piśmiennictwo	46
8. Wykaz publikacji i manuskryptów	55
9. Oświadczenia współautorów publikacji	138

Spis publikacji i manuskryptów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Praca 1.

Napora P, Kobrzycka A, Wieczorek M. 2020. „Prostaglandyna E2 jako cząsteczka komunikacji pomiędzy układem nerwowym i odpornościowym”. *Kosmos*. 69(2), 287-300. doi.org/10.36921/kos.2020_2559

20 pkt. MEiN

Praca 2.

Napora P, Kobrzycka A, Pierzchała-Koziec K, Wieczorek M. 2023. „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain”. *Behavioural Brain Research*. 438(2023), 114143. doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114143

100 pkt. MEiN, 3.332 IF

Praca 3.

Napora A, Kobrzycka A, Pierzchała-Koziec K, Wieczorek M. “Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain”.

Manuskrypt, dnia 05.04.2023. przesłany do publikacji w *Behavioural Brain Research*, 100 pkt. MEiN, 3.332 IF

Praca doktorska została zrealizowana w ramach grantu NCN (2012/07/B/NZ4/00205) zatytułowanego „Interakcje układu nerwowego i odpornościowego w mechanizmach kompensacyjnych na poziomie molekularnym i komórkowym”

Wykaz skrótów

AA – kwas arachidonowy (ang. *arachidonic acid*)

COX – cyklooksygenaza

PGE2 – prostaglandyna E2

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

BBB – bariera krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*)

HPA – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*)

PVN – jądro przykomorowe (ang. *paraventricular nucleus*)

CRH – kortykoliberyna, hormon uwalniający kortykotropinę (ang. *corticotropin releasing hormone*)

IL-1 β – interleukina 1 β

IL-6 – interleukina 6

NTS – jądro pasma samotnego (łac. *nucleus tractus solitarii*)

ACh – acetylocholina

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

CNT – grupa kontrolna

SC560 – 5-(4-chlorofenylo)-1-(4-metoksyfenylo)-3-trifluorometylopirazol

CEL – celekoksyb, 4-[5-(4-metylofenylo)-3-(trifluorometylo)pirazol-1-ilo]benzenosulfonamid

LPS – lipopolisacharyd (*Escherichia coli* 026:B6)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

RIA – metoda radioimmunologiczna

ELISA – test immunoenzymatyczny

TNF- α – czynnik martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor α*)

EPM – test uniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated plus maze*)

MANOVA – test wielowymiarowej analizy wariancji (ang. *multivariate analysis of variance*)

MHPG – 3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikol

DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy

HVA – kwas homowanilinowy

5-HIAA – kwas 5-hydroksyindoliloctowy

LC – miejsce sinawe (ang. *locus coeruleus*)

ANA – anandamid (ang. *anandamide*)

COMT – katecholo-O-metylotransferaza

IDO – 2,3-dioksygenaza indolaminowa

MUPs – główne białka moczu (ang. *major urinary proteins*)

NMDA – receptor N-metylo-asparagianu (ang. *N-methyl-aspartate receptor*)

GABA – kwas gamma-amino masłowy

AP – pole najdalsze (ang. *area postrema*)

AMB – jądro dwuznaczne (ang. *nucleus ambiguus*)

1. Wprowadzenie

Homeostaza to zdolność organizmu do utrzymania względnie stałego środowiska wewnętrznego, niezależnie od stale zmieniających się czynników pochodzenia zewnętrznego. Jest ona kluczowa dla właściwego funkcjonowania i przeżycia organizmów żywych. Zaburzeniu homeostazy u zwierząt najczęściej towarzyszą problemy zdrowotne, mogące prowadzić do powstawania chorób [BILLMAN 2020]. Istnieje wiele czynników wewnętrznych oraz zewnętrznych wpływających na homeostazę. Każdy proces zachodzący w żywym organizmie jest istotny, a jego nadmierna stymulacja lub inhibicja może wywoływać negatywne efekty. Z drugiej strony, organizm zwierzęcy pozostaje w stałym kontakcie z czynnikami zewnętrznymi, które w większości nie sprzyjają utrzymaniu homeostazy [SHIRES 1989]. Zwierzęta w toku ewolucji wykształciły bariery zapewniające ograniczony kontakt z otoczeniem, są to m. in.: skóra wraz z jej wydzielinami, tkanki zlokalizowane w przewodzie pokarmowym, płucach oraz nerkach. Niestety nie zapewniają one takiej ochrony, która umożliwiłaby całkowite ograniczenie działania czynników zewnętrznych [ARISTIZÁBAL i GONZÁLEZ 2013]. Dlatego, zwierzęta wykształciły wyspecjalizowany układ odpornościowy, zdolny do neutralizowania szkodliwych czynników wewnętrznych oraz zewnętrznych. Więcej, aby utrzymać homeostazę, a tym samym sprawność i zdrowie organizmu, cały szereg komórek, tkanek oraz narządów powinien działać skoordynowanie i błyskawicznie. Za taką koordynację odpowiada współdziałanie układu nerwowego i odpornościowego oraz hormonalnego [DANTZER 2018].

Podczas naruszenia integralności barier chroniących organizm dochodzi do inwazji patogenów i ich wnikania do ustroju. Takie zdarzenia wywołują wzbudzenie układu odpornościowego, czego efektem jest indukcja stanu zapalnego oraz uruchomienie szeregu mechanizmów mających na celu zwalczenie czynnika szkodliwego. Jednym z takich mechanizmów jest sekrecja z komórek układu odpornościowego różnorodnych biologicznie aktywnych związków o wielokierunkowym działaniu [MARSHALL i współaut. 2018]. Uwolnione molekuly uczestniczą w: informowaniu pozostałych komórek o potencjalnym zagrożeniu, indukowaniu stanu zapalnego oraz współtworzeniu szlaku humoralnej odpowiedzi odpornościowej [DANTZER 2018]. Ponadto, podczas inwazji patogenów, wynikającej z uszkodzenia tkanek organizmu, dochodzi do uwolnienia fosfolipidów błonowych, w tym kwasu arachidonowego (ang. *arachidonic acid*, AA). Następnie AA może być metabolizowany przez cyklooksygenazy (COX) i przekształcany do: prostaglandyn, prostacyklin lub tromboksanów. W tym przypadku, szczególną rolę pełni prostaglandyna E2 (PGE2), która wykazuje właściwości prozapalne oraz stanowi istotny sygnał aktywujący komórki odpornościowe [HIGGINS i LEES 1984].

Poza korzystnym działaniem, w kontekście zwalczania obwodowej infekcji, PGE2 oddziałuje również na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) indukując mechanizmy obronne [PECCHI i współaut. 2009]. Klasycznym przykładem takiego mechanizmu, uruchamianym m. in. przez PGE2, polegającym na zmianie wzorca zachowań zwierzęcia jest indukcja tzw. „zbioru zachowań chorobowych” (ang. *sickness behaviour*). Jest to odpowiedź adaptacyjna organizmu, która poprzez zaoszczędzenie energii, ma na celu przyspieszenie

powrotu organizmu do zdrowia [MAES i współaut. 2012]. Zwiększanie rezerw energetycznych przeznaczonych na walkę z patogenami odbywa się głównie przez ograniczenie aktywności fizycznej. U chorego zwierzęcia objawia się to: sennością, zmniejszoną aktywnością lokomotoryczną, ograniczoną eksploracją środowiska lecz również deficytami poznawczymi [MAES i współaut. 2012]. Ponadto, chore zwierzę izoluje się od innych osobników w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się patogenów [LOPES i współaut. 2016].

Kolejnym mechanizmem walki z infekcją jest indukcja gorączki związanej ze stanem zapalnym. Jak wcześniej wspomniano podczas zakażenia patogenami dochodzi do rozwoju stanu zapalnego oraz zwiększa się stężenie PGE₂ w płynach ustrojowych. Warto nadmienić, iż źródłem PGE₂ w organizmach ssaków nie są jedynie komórki odpornościowe (monocyty, makrofagi) lecz również śródbłonek naczyń włosowatych mózgu lub osteoblasty i fibroblasty wzbudzone przez cytokiny prozapalne [SAPER i współaut. 2012]. Następnie wytworzone i uwolnione do krwiobiegu cząsteczki PGE₂ mogą penetrować barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) i oddziaływać na OUN [DANTZER 2018]. W kolejnym etapie stanu zapalnego towarzyszącego infekcji, PGE₂ obecna w parenchymie mózgu wiąże się z receptorami EP₃ zlokalizowanymi w obrębie pola przedwzrokowego podwzgórza. Powoduje to zmianę punktu nastawczego termoregulacji powyżej 37°C, a organizm rozpoczyna „produkcję” ciepła (np. poprzez termogenezę drżeniową) [ESKILSSON i współaut. 2017]. Takie podwyższenie temperatury wpływa na wiele funkcji komórek odpornościowych, m. in.: zwiększenie ruchliwości monocytów, intensyfikację wytwarzania reaktywnych form tlenu przez neutrofile, a także na zwiększenie aktywności komórek NK, komórek dendrytycznych i limfocytów pomocniczych T [WROTEK i współaut. 2021]. Warto zaznaczyć, że szczury z delecją genu odpowiedzialnego za syntezę COX-2 lub mikrosomalnej syntazy prostaglandyny (mPGES) w śródbłonku naczyń włosowatych mózgu, wykazują osłabioną zdolność do indukcji gorączki [ESKILSSON i współaut. 2017]. Wydaje się, że w związku z krótkim okresem półtrwania cząsteczki PGE₂, kluczową rolę odgrywa odległość między miejscem syntezy i miejscem działania tego związku. Wskazuje to na fakt, iż PGE₂ pochodząca ze śródbłonka naczyń włosowatych mózgu odgrywa niezwykle istotną rolę w uruchomieniu mechanizmu gorączki indukowanej stanem zapalnym [ESKILSSON i współaut. 2017].

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż PGE₂ wpływa na procesy odpornościowe również poprzez aktywację osi podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy (HPA) [YOUNG i współaut. 1996]. Po przeniknięciu do parenchymy mózgu PGE₂ wiąże się z receptorami EP₃ zlokalizowanymi w obrębie jądra przykomorowego podwzgórza (ang. *paraventricular nucleus of hypothalamus*, PVN) [LV i współaut. 2021]. Prowadzi to do aktywacji PVN i uwalniania kortykoliberyny (ang. *corticotropin-releasing hormone*, CRH), która oddziałuje następnie na przysadkę mózgową. Efektem tego działania jest sekrecja do krążenia obwodowego kortykotropiny (ACTH), która pobudza korę nadnerczy do wydzielania glikokortykoidów. Wzrastające w osoczu krwi stężenie glikokortykoidów prowadzi do hamowania aktywności komórek odpornościowych wykorzystując różne mechanizmy, do których zaliczyć można np. hamowanie produkcji IL-1 β lub IL-6 [ELANDER i współaut. 2009, STREHL i współaut. 2019].

Komórki wzbudzonego układu odpornościowego generują szereg związków biologicznie aktywnych, których jednym z zadań jest przekazywanie sygnału do OUN. Do takich związków zaliczane są: cytokiny, opioidy, hormony tkankowe (np. histamina) oraz prostaglandyny, w szczególności PGE2 [DANTZER 2018, CARTHY i ELLENDER 2021]. Z drugiej strony, OUN również przekazuje do układu odpornościowego informacje zawarte w wydzielonych na obwód organizmu związkach. Są nimi: glikokortykoidy, neurotransmitery oraz neuropeptydy [PAVLOV i współaut. 2018]. Ten precyzyjny system komunikacji układu odpornościowego i nerwowego, oparty na biologicznie aktywnych związkach chemicznych, został nazwany drogą humoralną [DANTZER 2000].

Niezależnie od opisanego powyżej systemu przekazywania informacji zwierzęta wykształciły odrębny, wykorzystujący sygnały przewodzone za pośrednictwem czuciowych nerwów obwodowych. W literaturze przedmiotu ten system jest opisywany jako droga neuronalna, a jednym z jego głównych i zarazem najważniejszych reprezentantów jest nerw błędny [DANTZER 2000]. Jest to najdłuższy nerw czaszkowy, biegnący od pnia mózgu poprzez szyję i klatkę piersiową, aż do jamy brzusznej [BREIT i współaut. 2018]. Unerwia on wiele tkanek i narządów, które stanowią „wrota” inwazji dla patogenów lub są zaangażowane w przebieg procesów istotnych dla funkcjonowania układu odpornościowego [REARDON i współaut. 2018]. Zdecydowaną większość nerwu błędnego stanowią włókna czuciowe (afferentne), które unerwiają organy takie jak: serce, przewód pokarmowy, płuca i oskrzela. Sygnały rejestrowane za pośrednictwem tych włókien są przekazywane do jądra pasma samotnego (łac. *nucleus tractus solitarius*, NTS) – centralnego jądra czuciowego nerwu błędnego. Poprzez włókna ruchowe (eferentne) kontroluje on głównie aktywność mięśni krtani i gardła [PAVLOV i TRACEY 2012, BREIT i współaut. 2018]. Z kolei, poprzez należące do układu autonomicznego włókna eferentne dociera do większości narządów klatki piersiowej, są to m. in.: tchawica, serce, oskrzela i płuca. Ponadto, włókna te unerwiają również narządy jamy brzusznej: jelito cienkie i grube, żołądek oraz wątrobę [REARDON i współaut. 2018, KENNY i BORDONI 2021].

Nerw błędny jako główny reprezentant drogi neuronalnej przekazuje informacje czuciowe do OUN z narządów, które ze względu na pełnione funkcje, są potencjalnie narażone na kontakt z patogenami. Równocześnie aktywność jego części eferentnej prowadzi do wyzwolenia reakcji obronnych organizmu. Reakcje te mogą przybierać postać odruchu: kichania, połykania lub odruchu wymiotnego [BREIT i współaut. 2018]. Z drugiej strony, wydzielanie acetylocholino (ACh) z zakończeń włókien autonomicznych na obwodzie organizmu hamuje aktywność układu odpornościowego. Jest to możliwe dzięki obecności receptorów $\alpha 7nAChR$ na powierzchni wielu komórek odpornościowych (m. in. makrofagów, komórek dendrytycznych). Efektem połączenia ACh ze wspomnianym receptorem jest zahamowanie syntezy i uwalniania cytokin prozapalnych przez komórki odpornościowe [GALLOWITSCH-PUERTA i PAVLOV 2007, PAVLOV i TRACEY 2012]. Mechanizm ten jest znany pod nazwą „odruchu zapalnego” i odpowiada za kontrolę odpowiedzi immunologicznej oraz stanu zapalnego związanego z infekcją lub uszkodzeniem tkanek [PAVLOV i TRACEY 2012].

W odniesieniu do drogi humoralnej, warto zaznaczyć, iż PGE₂ uczestniczy w przebiegu procesów patofizjologicznych jak i fizjologicznych, które zachodzą w OUN. W warunkach „normalnych” PGE₂ uczestniczy w regulacji procesów związanych z aktywnością synaptyczną, plastycznością neuronalną oraz, w przypadku młodych organizmów, z dojrzewaniem mózgu [ALIX i współaut. 2008]. Wykazano, że ekspresja cyklooksygenazy zachodzi na stałym poziomie w wielu obszarach mózgu ssaków. Do obszarów, które charakteryzują się przewagą ekspresji COX-1 zalicza się: śródmózgowie, most oraz rdzeń przedłużony [MINGHETTI 2004]. Druga izoforma cyklooksygenazy wykazuje dominację głównie w hipokampie lecz potwierdzono również jej występowanie w strukturach takich jak: kora mózgu, ciało migdałowe, wzgórze oraz podwzgórze. Na uwagę zasługuje fakt, iż neuronalna ekspresja COX-2 może wzrastać w odpowiedzi na nadmierną aktywność synaptyczną (np. podczas napadów padaczkowych). Z drugiej strony, ekspresja COX-2 spada w odpowiedzi na działanie glikokortykoidów. Korelacja między ekspresją i aktywnością synaptyczną wskazuje na istotny udział COX-2 w przebieg procesów związanych z wymianą informacji między neuronami [MINGHETTI 2004]. W ludzkiej oraz psiej korze mózgu potwierdzono istnienie trzeciej izoformy tego enzymu (COX-3), uważanej przez niektórych badaczy za specyficzny wariant COX-1 [BOTTING i AYOUB 2005]. Niestety funkcje pełnione przez tę izoformę w obrębie OUN nie są wystarczająco dobrze poznane i wymagają dalszych badań klinicznych oraz eksperymentalnych [CHANDRASEKHARAN i współaut. 2002].

Inhibitory COX należą do szerokiej grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), stosowanych w leczeniu bólu, stanów zapalnych oraz kontroli gorączki [GHLICHLOO i GERRIETS 2022]. Pośród NLPZ występują związki zdolne do selektywnego hamowania aktywności COX-1 lub COX-2. Obecnie w terapii wspomnianych dolegliwości stosuje się związki o działaniu nieselektywnym oraz selektywnym w stosunku do COX-2 [ZARGHI i ARFAEI 2011]. Już od dekad lekarze zdawali sobie sprawę, że neutralizowanie bólu, gorączki oraz stanu zapalnego polega głównie na hamowaniu aktywności COX-2. Takie selektywne podejście miało na celu ograniczenie negatywnych skutków inhibicji COX-1, której rola odnosi się głównie do regulacji pracy narządów wewnętrznych [ZARGHI i ARFAEI 2011]. Długotrwałe hamowanie aktywności COX-1 może prowadzić do wystąpienia szeregu groźnych dla zdrowia dolegliwości m. in. powstawania nadżerek żołądkowo-jelitowych, a nawet wrzodów żołądka, niewydolności nerek oraz wątroby [SULEYMAN i współaut. 2007]. Niestety, popularny paradygmat według, którego COX-1 pełni funkcje fizjologiczne, natomiast COX-2 raczej „patofizjologiczne” nie jest do końca prawidłowy [MINGHETTI 2004]. Dowodem potwierdzającym to założenie jest fakt, wycofania ze sprzedaży popularnego niegdyś inhibitora COX-2, rofekoksybu (nazwa handlowa - *Vioxx*). Jego długotrwałe stosowanie prowadziło do powstawania zaburzeń pracy nerek oraz układu sercowo-naczyniowego. Najczęstszymi przyczynami śmierci pacjentów stosujących *Vioxx* był udar mózgu lub zawał mięśnia sercowego [SIBBALD 2004].

Niezależnie od skutków ubocznych wywoływanych przez długoterminowe stosowanie NLPZ, są one w dalszym ciągu produkowane na masową skalę i stosowane przez coraz większą liczbę ludzi [REGUŁA i współaut. 2011]. Obecnie mamy do czynienia z globalnym

nadużywaniem NLPZ, które bez wątpienia można nazwać „epidemią stosowania leków przeciwbólowych”. Szacuje się, że codziennie około 30 milionów ludzi stosuje NLPZ, a około 40% z nich przekroczyło 60 rok życia. Jest to związane z kilkoma czynnikami, do których zaliczyć można: powszechną dostępność, brak wymogu recepty, siłę reklamy, występowanie chorób związanych z przewlekłym stanem zapalnym (np. reumatoidalne zapalenie stawów) oraz stosunkowo niski koszt leków [REGUŁA i współaut. 2011, CRYER i współaut. 2016].

2. Cel rozprawy doktorskiej

Produkt aktywności enzymatycznej cyklooksygenaz PGE₂ pełni niezwykle istotną rolę podczas wymiany informacji między wzbudzonym układem odpornościowym a OUN. Podczas trwającego na obwodzie organizmu stanu zapalnego dochodzi do aktywacji COX-2 w obrębie uszkodzonych tkanek, w niektórych komórkach odpornościowych (np. w monocytach, makrofagach) oraz w śródbłonku naczyń włosowatych mózgu. Ponadto, powstała PGE₂ oddziałując lokalnie, w miejscach syntezy, wpływa również na powstawanie kolejnych mediatorów stanu zapalnego. PGE₂ przenika do parenchymy mózgu, w której oddziałuje na struktury o potencjalnym działaniu immunomodulującym oraz immunosensorycznym. Wiadomo, że wpływa ona na aktywność obszaru przedwzrokowego w podwzgórzu, co skutkuje podwyższeniem temperatury organizmu a nawet wystąpieniem gorączki. Warto nadmienić, iż funkcją podwyższonej temperatury organizmu jest zwiększenie aktywności układu odpornościowego oraz osłabienie namnażania patogenów. PGE₂ indukuje również *sickness behaviour*, będący kluczowym mechanizmem behawioralnym, odpowiadającym za szybszy powrót organizmu do zdrowia. Z drugiej strony, PGE₂ wywiera istotny wpływ na oś HPA, regulując tym samym poziom wzbudzenia układu odpornościowego. Mając na uwadze powyższe właściwości omawianej cząsteczki, głównym celem pracy było sprawdzenie czy istnieją mechanizmy mogące kompensować ograniczenie syntezy PGE₂ po długotrwałym hamowaniu aktywności cyklooksygenaz.

Hipoteza badawcza:

- wyłączenie humoralnej drogi komunikacji odpornościowo-nerwowej uruchamia mechanizmy, które kompensują jej brak.

Cel główny:

- określenie czy długotrwałe hamowanie aktywności humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej doprowadzi do uruchomienia potencjalnych mechanizmów kompensujących jej zaburzenie oraz ustalenie ich charakteru.

Cele dodatkowe

- określenie wpływu długotrwałego hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 na neurotransmisję monoaminergiczną w OUN szczura,

- zdefiniowanie wpływu długotrwałego hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 na neurotransmisję aminokwasową w OUN szczura,
- sprawdzenie potencjalnych zmian stężenia mediatorów reakcji zapalnej w osoczu krwi szczurów po długotrwałym hamowaniu aktywności cyklooksygenaz,
- określenie wpływu długotrwałego podawania inhibitorów cyklooksygenaz na zachowanie zwierząt.

Przedstawione cele zostały zrealizowane i omówione w dwóch zamieszczonych pracach:

Praca 1. „Prostaglandyna E2 jako cząsteczka komunikacji pomiędzy układem nerwowym i odpornościowym”

Pracę pierwszą stanowi artykuł przeglądowy. Jego celem było przedstawienie kluczowych informacji dotyczących roli PGE2 w procesie komunikacji nerwowo-odpornościowej.

Praca 2. „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain”

Celem pracy było określenie wpływu długotrwałego zahamowania aktywności cyklooksygenaz na funkcjonowanie monoaminergicznych układów neurotransmisyjnych w wybranych obszarach mózgowia szczurów. Sprawdzone również jak zmienia się aktywność wspomnianych systemów podczas eksperymentalnie indukowanego stanu zapalnego. W przedstawionej pracy zwierzętom podawano selektywne inhibitory cyklooksygenaz przez dziesięć dni, a następnie oznaczano zawartość monoamin w wybranych strukturach OUN. Ustalony, dziesięciodniowy cykl codziennego podawania odpowiednich inhibitorów cyklooksygenaz był wystarczający, aby umożliwić badanie wywołanych przez nie skutków. Zapobiegał on również powstawaniu nadmiernych zaburzeń pracy narządów wewnętrznych u zwierząt. W doświadczeniu sprawdzano jednocześnie jak organizm zwierząt reaguje na podawane inhibitory w warunkach septycznych (dootrzewnowa iniekcja lipopolisacharydu).

Hipoteza badawcza zamieszczona w omawianej pracy zakładała, że efektem długotrwałego hamowania aktywności cyklooksygenaz będzie pojawienie się zmian w funkcjonowaniu monoaminergicznych układów neurotransmisyjnych. Założono, również że powstałe zmiany będą kompensować zaburzenie wymiany informacji między układem odpornościowym i OUN, wynikającym z zahamowania aktywności cyklooksygenaz. Ponadto, spodziewano się, że zmieniona aktywność układów neurotransmisyjnych będzie objawiać się zmodyfikowanym zachowaniem zwierząt eksperymentalnych.

Praca 3. „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain”

Celem badań, których wyniki opisano w kolejnej pracy było określenie wpływu długotrwałego podawania inhibitorów cyklooksygenaz na aktywność aminokwasowych układów neurotransmisyjnych. W przeprowadzonym doświadczeniu zwierzętom przez 10 dni podawano selektywne inhibitory cyklooksygenaz. w warunkach septycznych i nieseptycznych. Analiza neurochemiczna obejmowała oznaczenie głównych aminokwasów pobudzających, hamujących oraz aminokwasów, które są prekursorami neuroprzekaźników monoaminowych.

W odniesieniu do tego eksperymentu założono, że długotrwałe podawanie inhibitorów cyklooksygenaz doprowadzi do powstania zmian w aktywności aminokwasowych układów neurotransmisyjnych. Analogicznie w stosunku do pracy drugiej, założono, że powstałe zmiany będą wynikiem uruchomienia mechanizmów kompensujących zaburzenie humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej.

3. Materiał i metody badawcze

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Do realizacji doświadczeń wykorzystano trzymiesięczne, w chwili rozpoczęcia doświadczenia, samce szczurów stada nie krewniaczego Wistar. Zostały one zakupione z hodowli należącej do Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Łączna liczba zwierząt, od których pobrano materiał biologiczny była równa (N=168). Zwierzęta poddano trwającej 7 dni habituacji. Jej celem było przyzwyczajenie zwierząt do eksperymentatorów oraz do warunków panujących w zwierzętarni. Każde ze zwierząt zostało umieszczone w oddzielnej klatce oraz posiadało dostęp do wody pitnej i pożywienia *ad libitum*. Ustalono 12-godzinny cykl dzień-noc, podczas którego lampy włączano o godzinie 7:00. Temperatura w miejscu przebywania zwierząt była ustalona na 21–22 °C, a wilgotność powietrza na 60-65%.

3.2. Procedury doświadczalne

Wszystkie procedury eksperymentalne, którym poddano zwierzęta zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną w Łodzi (nr. uchwał: 73/ŁB582/2012 oraz 56/ŁB114/2018).

Podczas planowania eksperymentu wyróżniono trzy grupy zwierząt: kontrolną (CNT), której podawano 0.9% roztwór NaCl, grupę (SC560), w obrębie, której zwierzęta otrzymywały SC560, inhibitor COX-1 oraz grupę (CEL), której podawano celekoksyb, inhibitor COX-2. Zwierzęta doświadczalne przez 10 dni otrzymywały podskórne (ang. *subcutaneous*, s.c) iniekcje z: 0.9% roztworu NaCl, SC560 (3 mg/kg m.c) lub celekoksybu (10 mg/kg. m.c) zawieszonych w 100 μ l 0.9% roztworu NaCl. U połowy zwierząt z każdej grupy losowo wykonano dootrzewnowe (ang. *intraperitoneal*, i.p), jednorazowe iniekcje 10 μ g lipopolisacharydu (LPS, *Escherichia coli* 026:B6) rozpuszczonego w 100 μ l 0.9% roztworu NaCl. Drugiej połowie zwierząt podawano dootrzewnowo 0.9% roztwór NaCl.

Następnie, po upływie 120 minut od dootrzewnowej iniekcji zwierzęta z każdej grupy poddano 5-minutowym testom behawioralnym, a po ich zakończeniu procedurze eutanazji. Zwierzęta, u których nie wykonywano testów behawioralnych zostały poddane eutanazji po upływie 125 minut. Pobrany od zwierząt materiał biologiczny stanowił:

- wybrane struktury mózgowia: pień mózgu, podwzgórze, kora mózgu, hipokamp, przyśrodkowa kora przedczołowa, ciała migdałowe, istota szara okołowodociągowa [praca 2 i 3]
- osocze, wyizolowane z krwi pochodzącej z tułowia zwierząt [praca 2 i 3]

3.3. Techniki pomiarowe i metody

3.3.1. Oznaczanie stężenia monoamin i aminokwasów neurotransmisyjnych w OUN

Bezpośrednio po pobraniu, wybrane struktury mózgowia poddano homogenizacji ultradźwiękowej w roztworze kwasu nadchlorowego z dodatkiem pirosiarczynu sodowego jako przeciwutleniacza. Następnie materiał odwirowano i pobrano supernatant, który został umieszczony w specjalnych probówkach chromatograficznych. Materiał poddany takim procedurom zabezpieczono i przechowywano w zamrażarce, w temperaturze -80°C do czasu analiz chromatograficznych.

Analizy chromatograficzne przeprowadzono przy użyciu zestawu do wysokosprawnej chromatografii ciekowej, Agilent 1100, połączonego z detektorem elektrochemicznym (HP-1049A). Do wykonywania analiz zastosowano metodę wzorca zewnętrznego. Oznaczenia neuroprzekaźników monoaminergicznych oraz ich metabolitów dokonano metodą elucji izokratycznej w fazie ruchomej (składającej się z buforu fosforanowego i metanolu) [praca 2]. Oznaczenie neuroprzekaźników aminokwasowych oraz pozostałych aminokwasów wykonano za pomocą metody elucji gradientowej ze zmiennym składem fazy ruchomej (zmiennie stężenie buforu fosforanowego oraz metanolu). Podczas analizy aminokwasów wykorzystano przedkolumnową derywatyzację przy użyciu odczynnika OPT (aldehydu o-ftalowego) [praca 3]. Po uzyskaniu chromatogramów zarówno dla monoamin jak i aminokwasów, przeprowadzono ich analizę wykorzystując oprogramowanie Chemstation, Revision-B.03.02, Agilent.

3.3.2. Oznaczanie stężenia kortykosteronu w osoczu krwi

Kortykosteron oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA), przy użyciu gotowego zestawu odczynników (Corticosterone Rat/Mouse kit DRG international), wykorzystując licznik RIA Wizzard 1470 Perkin-Elmer. Podczas oznaczania hormonu stosowano się do instrukcji oraz zaleceń producenta.

3.3.3. Oznaczanie stężenia cytokin prozapalnych w osoczu krwi

Analiza cytokin prozapalnych, zawartych w osoczu krwi została przeprowadzona metodą ELISA, wykorzystując czytnik EPOCH 2 Biotek. Podczas analizy wykorzystano oprogramowanie GEN-5. Do oznaczenia cytokin wykorzystano gotowe zestawy odczynników IL-1 β (Rat IL-1 β ELISA Kit, Diaclone), IL-6 (Human IL-6 Kit, Invitrogen), TNF- α (Rat TNF- α ELISA Kit, Diaclone). Oznaczanie cytokin przebiegało zgodnie z instrukcją oraz zaleceniami producenta.

3.3.4. Analiza behawioralna

Zachowanie zwierząt badano przy użyciu testu uniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated plus maze*, EPM), który umożliwia ocenę aktywności lokomorycznej oraz poziomu lęku. Zwierzęta poddawane testowi EPM były wybierane w sposób losowy (zgodnie z zasadami randomizacji). Szczury eksplorowały powierzchnię areny przez 5 minut w obecności rozproszonego światła czerwonego. Po każdym przeprowadzonym teście powierzchnia areny była dezynfekowana przy użyciu 70% alkoholu etylowego. Nagrania video z przeprowadzonych testów EPM zostały zgromadzone na elektronicznym nośniku danych. Ich analiza została wykonana przy użyciu oprogramowania EthoVision 11.5 (Noldus, Wageningen, The Netherlands).

3.3.5. Analiza statystyczna

Opracowanie uzyskanych danych wykonano za pośrednictwem oprogramowania STATISTICA 13.3 (TIBICO software inc. 2017). Każda analiza statystyczna rozpoczynała się od sprawdzenia normalności rozkładu danych przy użyciu testu Shapiro-Wilka. W sytuacji gdy uzyskane dane nie wykazywały rozkładu normalnego, wykonywano odpowiednie przekształcenia, np. Boxa-Coxa, mające na celu ich normalizację. Po każdym przekształceniu dane były ponownie sprawdzane pod kątem normalności rozkładu.

Dane neurochemiczne prezentowane w pracy 2 wykazywały rozkład skośny, dlatego do analizy statystycznej wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitney'a (z poprawką Bonferroniego na liczbę porównań). W przypadku danych dotyczących zawartości cytokin prozapalnych i kortykosteronu procedura analizy statystycznej była analogiczna. W związku z faktem, iż dane behawioralne spełniały kryteria dla testów parametrycznych, do analizy wykorzystano test wielowymiarowej analizy wariancji (ang. *multivariate analysis of variance*, MANOVA). Dodatkowo, w celu określenia preferencji zwierząt do przebywania w lewym lub prawym zamkniętym ramieniu areny EPM, wykorzystano test Wilcoxon dla prób zależnych.

Dane opisywane w pracy 3 nie spełniały kryteriów umożliwiających wykorzystanie testów parametrycznych do ich analizy statystycznej. Pomimo przekształceń mających na celu normalizację rozkładu, zarówno dane neurochemiczne jak i te dotyczące zawartości związków prozapalnych w osoczu krwi, nie wykazywały rozkładu normalnego. Z tego powodu do ich analizy wykorzystano test U Manna-Whitney'a (z poprawką Bonferroniego na liczbę porównań).

Przy wykonywaniu analizy statystycznej podjęto próby falsyfikacji poniższych hipotez:

- NaCl s.c + NaCl i.p. (CNT) vs NaCl + LPS i.p.: iniekcja LPS nie wpływa na wartość badanej zmiennej.
- NaCl s.c + NaCl i.p. vs CEL s.c + NaCl i.p.: długoterminowe podawanie celekoksybu nie wpływa na wartość badanego parametru.
- NaCl s.c + LPS i.p. vs CEL s.c + LPS i.p.: iniekcja LPS nie wpływa na wartość badanej zmiennej u zwierząt z długotrwanie hamowaną aktywnością COX-2.
- NaCl s.c + NaCl i.p. vs SC560 s.c + NaCl i.p.: długoterminowe podawanie SC560 nie wpływa na wartość oznaczanego parametru.
- NaCl s.c + LPS i.p. vs SC560 s.c + LPS i.p.: iniekcja LPS nie wpływa na wartość badanej zmiennej u zwierząt z długotrwanie hamowaną aktywnością COX-1.
- CEL s.c + NaCl i.p. vs SC560 s.c + NaCl i.p.: brak różnic w wartości zmiennej podczas długotrwałego hamowania aktywności obu izoform COX.
- CEL s.c + LPS i.p. vs SC560 s.c + LPS i.p.: iniekcja LPS nie wpływa na wartość zmiennej podczas długotrwałego hamowania aktywności obu izoform COX.

4. Omówienie wyników

Ze względu na dużą liczbę danych uzyskanych w przeprowadzonym doświadczeniu, zdecydowano, iż opisane zostaną jedynie takie wyniki porównań międzygrupowych, które wykazywały istotność statystyczną. Takie podejście miało na celu zwiększenie przejrzystości oraz ułatwienie odbioru prezentowanej pracy.

4.1. Wpływ inhibitorów COX na zawartość cytokin prozapalnych w osoczu krwi zwierząt w warunkach septycznych i nieseptycznych

Przeprowadzone doświadczenia umożliwiły obserwację wpływu eksperymentalnie wywołanego stanu zapalnego na stężenie cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α) w osoczu krwi zwierząt. W związku z tym, że dootrzewnowe podanie LPS skutkowało wzrostem stężenia wymienionych cytokin, można zakładać, iż zarówno jakość jak i ilość podawanego związku były na właściwym poziomie.

4.2. Cytokiny prozapalne

Analizując stężenie IL-1 β zaobserwowano jedną istotnie statystyczną różnicę w grupie zwierząt długotrwale otrzymujących SC560. Wykazano, że pomimo długoterminowego hamowania aktywności COX-1, iniekcja LPS w dalszym ciągu powoduje wzrost stężenia IL-1 β w osoczu krwi zwierząt eksperymentalnych. Zjawisko to, można wytłumaczyć faktem, iż cząsteczka PGE2 może wykazywać zdolność do ujemnego regulowania odpowiedzi immunologicznej. W tym przypadku hamowanie COX-1 z jednoczesnym osłabieniem syntezy PGE2 mogło doprowadzić do wzrostu stężenia IL-1 β . Wyniki potwierdzające zależność PGE2–IL-1 β zostały przedstawione w pracy zespołu HANGAI i współaut. 2016.

Kolejną cytokiną prozapalną, analizowaną w osoczu krwi zwierząt, była IL-6. Zaobserwowano, że dootrzewnowe podanie LPS powoduje wzrost stężenia tej cytokiny w grupie zwierząt kontrolnych. Co więcej, żaden z długotrwale podawanych inhibitorów nie zahamował wzrostu stężenia IL-6 w odpowiedzi na podanie endotoksyny.

Analiza statystyczna danych dotyczących zawartości TNF- α w osoczu krwi zwierząt wykazała istotny wpływ przeprowadzonych procedur eksperymentalnych. Dootrzewnowa iniekcja LPS spowodowała wzrost stężenia TNF- α u zwierząt kontrolnych. Długotrwale hamowanie aktywności COX-1 spowodowało obniżenie podstawowego stężenia TNF- α , u zwierząt bez eksperymentalnie indukowanego stanu zapalnego. Z kolei, podawanie zwierzętom SC560 prowadziło do silniejszego obniżenia stężenia TNF- α , w warunkach septycznych oraz nieseptycznych, w porównaniu do zwierząt, które otrzymywały celekoksyb. Zaobserwowano również, że żaden z długotrwale podawanych inhibitorów nie zapobiegał wzrostowi stężenia badanej cytokiny w odpowiedzi na dootrzewnową iniekcję LPS.

4.3. Kortykosteron

Analizując stężenie kortykosteronu w osoczu krwi zwierząt eksperymentalnych zaobserwowano istotną statystycznie różnicę. Wykazano, iż długoterminowe hamowanie aktywności COX-2 nie zapobiega wzrostowi stężenia kortykosteronu w odpowiedzi na dootrzewnowe podanie LPS.

4.4. Wpływ długoterminowego podawania inhibitorów cyklooksygenaz na neurotransmisję monoaminergiczną w wybranych strukturach OUN szczura

Badanie neurotransmisji monoaminergicznej polegało na oznaczaniu stężenia wybranych monoamin oraz ich metabolitów. Oznaczono stężenia: noradrenaliny, dopaminy i serotoniny oraz ich metabolitów: 3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikolu (MHPG), kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC), kwasu homowanilinowego (HVA) oraz kwasu 5-hydroksyindoliloctowego (5-HIAA). Uzyskane pozwoliły wyznaczyć tzw. „indeksy utylizacyjne”, czyli stosunki stężenia metabolitu do głównego neuroprzekaźnika. Dało to możliwość ilościowego przedstawienia metabolizmu: noradrenaliny (MHPG/NE), serotoniny (5-HIAA/5-HT) oraz wewnątrzkomórkowego (DOPAC/DA) i zewnątrzkomórkowego (HVA/DA) metabolizmu dopaminy. Im wyższa wartość danego indeksu, tym wyższa aktywność określonego układu neurotransmisyjnego. Stężenia wspomnianych związków mierzono w następujących obszarach OUN: pień mózgu, podwzgórze, hipokamp oraz przyśrodkowa kora przedczołowa. W związku z tym, że w doświadczeniu badano wpływ długoterminowego hamowania aktywności cyklooksygenaz, materiał biologiczny pochodził od zwierząt: kontrolnych oraz otrzymujących celekoksyb lub SC560, obserwowanych zarówno w warunkach septycznych oraz nieseptycznych.

4.4.1. Odpowiedź układu noradrenergicznego na długotrwałe hamowanie aktywności cyklooksygenaz

Analiza neurochemiczna wykazała istotne zmiany zawartości monoamin u zwierząt po długotrwałym podawaniu obu inhibitorów COX w badanych strukturach OUN. Zjawisko to miało miejsce zarówno u zwierząt „zdrowych” oraz tych, u których eksperymentalnie wywołano stan zapalny. Hamowanie aktywności COX-2 skutkowało wzrostem stężenia noradrenaliny w pniu mózgu niezależnie od stanu zapalnego. W przypadku hamowania aktywności COX-1 również dochodziło do wzrostu stężenia noradrenaliny w obrębie tej struktury lecz jedynie w warunkach nieseptycznych. Zaobserwowano, że hamowanie aktywności COX-2 powoduje silniejszy wzrost stężenia noradrenaliny w pniu mózgu, niż ma to miejsce w przypadku hamowania COX-1, niezależnie od stanu zapalnego. Kolejne zmiany zawartości noradrenaliny stwierdzono w przyśrodkowej korze przedczołowej. Inhibicja aktywności COX-2 spowodowała wzrost badanego parametru w tej strukturze, niezależnie od stanu zapalnego. Hamowanie aktywności COX-2 doprowadziło do intensywniejszego wzrostu stężenia noradrenaliny w przyśrodkowej korze przedczołowej, niż miało to miejsce w przypadku hamowania COX-1, u zwierząt po podaniu LPS. Podawanie zwierzętom inhibitora COX-2 w warunkach septycznych spowodowało spadek aktywności układu noradrenergicznego, wyrażonego stosunkiem MHPG/NE, w pniu mózgu oraz przyśrodkowej korze przedczołowej. Wiadomo, że obie te struktury uczestniczą w uruchamianiu mechanizmów adaptacyjnych w odpowiedzi na stresory fizyczne i psychiczne poprzez aktywację osi HPA [JANKORD i HERMAN 2008, ARNSTEN 2009,

ARNSTEN i współaut. 2015]. Prawdopodobnie, podczas ograniczenia syntezy PGE₂, odpowiedź tych struktur na dootrzewnowe podawanie LPS była osłabiona, co w konsekwencji mogło doprowadzić do braku aktywacji układu noradrenergicznego oraz magazynowania noradrenaliny w ich obrębie. Jednakże, reakcja układu noradrenergicznego na iniekcję LPS była nadal możliwa, ponieważ odnotowano wzrost stężenia MHPG w obrębie przyśrodkowej kory przedczołowej. Sugeruje to, że gdy szlak COX-2–PGE₂ ma ograniczoną aktywność, a transmisja sygnału prozapalnego do OUN zachodzi za pośrednictwem dróg alternatywnych, które w dalszym ciągu mogą aktywować układ noradrenergiczny [DANTZER 2018, MELLO-CARPES i IZQUIERDO 2013]. Z jednej strony, przekazywanie wspomnianego sygnału może odbywać się przy udziale pozostałych, aktywnych elementów drogi humoralnej, czyli za pośrednictwem cytokin prozapalnych. Z drugiej strony, sygnał informujący o obwodowym stanie zapalnym może docierać do OUN przy udziale w pełni sprawnej drogi neuronalnej, której głównym reprezentantem jest nerw błędny. Interesującym jest, że hamowanie aktywności COX-1 nie doprowadziło do powstania podobnych efektów w pniu mózgu i przyśrodkowej korze przedczołowej. Wynik ten wskazuje na dominującą rolę szlaku COX-2–PGE₂ w transmisji sygnału prozapalnego ponieważ zablokowanie COX-1 nie spowodowało obniżenia aktywności układu noradrenergicznego oraz akumulacji noradrenaliny w tych strukturach. Mechanizmem mogącym częściowo tłumaczyć akumulację noradrenaliny oraz spadek aktywności noradrenergicznej jest aktywacja specyficznych dla PGE₂ receptorów EP₃ w podwzgórzu, szczególnie w PVN. Wiadomo, że istnieje pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy PVN, wydzielającym CRH, a znajdującym się w pniu mózgu miejscem sinawym (ang. *locus coeruleus*, LC) uwalniającym noradrenalinę [SHIMIZU i współaut. 2014]. Podczas ograniczenia syntezy PGE₂ dochodzi do osłabienia aktywacji PVN i zmniejszenia sekrecji CRH, w efekcie czego można obserwować spadek aktywności LC. Konsekwencją tego może być osłabienie transmisji noradrenergicznej z LC do przyśrodkowej kory przedczołowej [TAYLOR i WESTLUND 2017]. Następnie w odpowiedzi na brak pobudzenia z LC w przyśrodkowej korze przedczołowej może dochodzić do osłabienia uwalniania noradrenaliny oraz jej akumulacji. Wydaje się, że zaobserwowane zmiany funkcjonowania układu noradrenergicznego w obrębie pnia mózgu oraz przyśrodkowej korze przedczołowej są wynikiem ingerencji inhibitorów cyklooksygenaz w opisany powyżej mechanizm (podpunkt „b” Ryc. 2 zamieszczona w pracy 2).

4.4.2. Reakcja układu dopaminergicznego w odpowiedzi na długotrwałe blokowanie aktywności cyklooksygenaz

Analiza aktywności układu dopaminergicznego wykazała, że długotrwałe podawanie obu inhibitorów cyklooksygenaz, w warunkach septycznych i nieseptycznych, powoduje istotne obniżenie stężenia dopaminy w podwzgórzu. Trwający na obwodzie organizmu stan zapalny spowodował istotne obniżenie stężenia dopaminy w obrębie hipokampa. Zaobserwowano również, że u „chorych” zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-2 dochodzi do obniżenia stężenia dopaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej.

Zwiększony zewnątrzkomórkowy metabolizm dopaminy wyrażony stosunkiem HVA/DA zaobserwowano w pniu mózgu zwierząt, bez stanu zapalnego, którym podawano celekoksyb lub SC560. Odnotowany wzrost wartości indeksu HVA/DA w podwzgórzu zwierząt eksperymentalnych stanowił odpowiedź na podawanie SC560 w warunkach septycznych i nieseptycznych. Podawanie celekoksybu również spowodowało wzrost indeksu HVA/DA lecz był on obserwowany jedynie u zwierząt nie otrzymujących LPS. Ponadto, wartość indeksu HVA/DA u zwierząt, u których wywołano stan zapalny i które otrzymywały SC560 była wyższa niż w przypadku tych, które otrzymywały celekoksyb w takich samych warunkach. Okazało się również, że jedyną procedurą zwiększającą zewnątrzkomórkowy metabolizm dopaminy w hipokampie było hamowanie aktywności COX-1 w warunkach nieseptycznych.

Intensywniejszy wewnątrzkomórkowy metabolizm dopaminy opisany jako wzrost stosunku DOPAC/DA odnotowano po zahamowaniu COX-1 oraz COX-2 w pniu mózgu zwierząt „zdrowych”. Blokowanie COX-2, bez iniekcji LPS, oraz COX-1, bez oraz wraz z iniekcją LPS, zwiększyło wartość indeksu DOPAC/DA w podwzgórzu. W obrębie hipokampa zwierząt, które otrzymywały celekoksyb lub SC560 w warunkach nieseptycznych odnotowano wyższe wartości indeksu DOPAC/DA. Na uwagę zasługuje fakt, iż mechanizmy odpowiedzialne za pozakomórkowy metabolizm dopaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej okazały się wrażliwe na zastosowane inhibitory cyklooksygenaz. Hamowanie COX-1 lub COX-2, u zwierząt które nie otrzymywały LPS i u tych, którym podawano LPS, powodowało istotny wzrost wartości indeksu DOPAC/DA w tej strukturze.

Uzyskane dane wskazują na wystąpienie ogólnego wzrostu aktywności układu dopaminergicznego w odpowiedzi na blokowanie aktywności cyklooksygenaz. Odnotowany wzrost aktywności obejmował rozległe obszary OUN: kresomózgowie (m. in. hipokamp i przyśrodkową korę przedczołową), międzymózgowie (m. in. podwzgórze) oraz pień mózgu. Jak wspomniano we wcześniejszych fragmentach pracy, ogólny wzrost aktywności układu dopaminergicznego objawiał się wykorzystaniem rezerw dopaminy, na skutek jej nadmiernego wydzielania oraz zwiększeniem jej zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowego metabolizmu. W celu wyjaśnienia opisanego zjawiska należałoby odnieść się do właściwości substratów wykorzystywanych przez obie izoformy cyklooksygenaz w OUN. Jak wiadomo, cyklooksygenazy, głównie COX-2, mogą metabolizować szczególnie endokannabinoid występujący w OUN – anandamid (ANA) [FOWLER 2007, GLASER i KACZOCHA 2010]. W związku z tym, można spodziewać się, że wynikiem długotrwałego blokowania aktywności cyklooksygenaz będzie wzrost stężenia ANA w obrębie OUN. Działanie tego endokannabinoidu opisano w jednej ze struktur układu dopaminergicznego (w jądrze półleżącym), w której doprowadził on do zwiększenia pozakomórkowego stężenia dopaminy [OZ i współaut. 2010]. Badacze sugerują, że ANA poprzez regulację funkcji błonowego transportera dopaminy wpływa na osłabienie wychwytu zwrotnego tej aminy ze szczeliny synaptycznej. Następnie zgromadzona w obrębie synapsy dopamina zostaje zmetabolizowana do HVA przez katecholo-O-metylostransferazę (COMT) i tym samym dochodzi do wzrostu wartości indeksu HVA/DA (podpunkt „a” Ryc.2 zamieszczona w pracy 2) [AKIL i współaut. 2003, POSNER i współaut. 2013].

Z racji tego, iż cyklooksygenazy wykazują aktywność peroksydaz, mogą obniżać stężenie dopaminy, poprzez jej utlenianie do szkodliwych chinonów i semichinonów [HASTINGS 1995]. Dopamina podlega również procesowi autooksydacji, w którym dochodzi do wytworzenia szkodliwych związków np. anionu ponadtlenkowego [UMEK i współaut. 2018, GRAVES i współaut. 2020]. Niemniej jednak, podczas długotrwałego blokowania aktywności COX-1 i COX-2 utlenianie dopaminy słabnie, co prawdopodobnie ma wpływ na wzrost jej wewnątrzkomórkowego stężenia. Warto również wspomnieć o fakcie, iż wewnątrz neuronu znajduje się oksydaza monoaminowa (MAO), która uczestniczy w procesie przekształcania cząsteczki dopaminy do postaci DOPAC [GARRETT i SOARES-DA-SILVA 1990]. GRAVES i współaut. 2020, sugerują, że MAO pełni w neuronie rolę ochronną ponieważ rozkłada dopaminę do DOPAC i zapobiega powstawaniu szkodliwych chinonów. Wydaje się logiczne, że w sytuacji nagromadzenia neuroprzekaźnika MAO będzie przekształcać do postaci DOPAC, w celu ochrony neuronu, czego efektem może być wzrost wartości indeksu DOPAC/DA.

Zaproponowane mechanizmy odpowiadające za wzrost aktywności układu dopaminergicznego stanowią jedynie założenia teoretyczne. Aby w pełni zrozumieć mechanizmy odpowiedzialne za przedstawione zjawisko należałoby przeprowadzić kolejne, wieloaspektowe badania, które wykorzystywałyby liczne techniki eksperymentalne. Nie zmienia to jednak faktu, iż wykorzystanie techniki chromatograficznej umożliwiło zaobserwowanie istotnego wpływu inhibicji COX-1 oraz COX-2 na aktywność układu dopaminergicznego.

4.4.3. Efekty hamowania aktywności cyklooksygenaz obserwowane w obrębie układu serotonergicznego

Przeprowadzone analizy neurochemiczne wykazały, że długotrwałe podawanie celekoksybu zwierzętom „zdrowym” wywołało wzrost stężenia serotoniny w pniu mózgu. Ponadto, zwierzęta otrzymujące celekoksyb charakteryzowały się wyższym stężeniem serotoniny w tej strukturze niż te, którym podawano SC560. Celekoksyb doprowadził również do osiągnięcia wyższego stężenia serotoniny w podwzgórzu zwierząt, niż miało to miejsce podczas podawania SC560 w warunkach septycznych. Na uwagę zasługują fakt, iż w obrębie hipokampa odnotowano przeciwną tendencję zmian zawartości tego neuroprzekaźnika. Zaobserwowano, że hamowanie aktywności COX-2 obniża stężenie serotoniny w hipokampie zwierząt podczas indukowanego eksperymentalnego stanu zapalnego. Jednakże blokowanie aktywności COX-2 w warunkach septycznych prowadzi do osiągnięcia wyższego stężenia badanej aminy, niż w przypadku hamowania aktywności COX-1. Długotrwałe podawanie SC560 powodowało obniżenie stężenia serotoniny w hipokampie niezależnie od stanu zapalnego. W przypadku przyśrodkowej kory przedczołowej odnotowano, iż długoterminowe hamowanie aktywności COX-2 powoduje spadek stężenia serotoniny niezależnie od stanu zapalnego.

Wykazano, iż indukcja eksperymentalnego stanu zapalnego lub hamowanie jednej z izoform cyklooksygenaz w warunkach nieseptycznych prowadzi do wzrostu aktywności

układu serotonergicznego (stosunek 5-HIAA/5-HT) w pniu mózgu. W podwzgórzu zwierząt niewykazujących symptomów stanu zapalnego, zaobserwowano wzrost aktywności układu serotonergicznego w odpowiedzi na hamowanie obu izoform cyklooksygenaz. Jedynym czynnikiem, powodującym wzrost wartości indeksu 5-HIAA/5-HT w hipokampie było blokowanie aktywności COX-1 w warunkach nieseptycznych. Ponadto, w przyśrodkowej korze przedczołowej odnotowano wzrost indeksu 5-HIAA/5-HT w odpowiedzi na podawanie celekoksylu lub SC560 niezależnie od stanu zapalnego.

Wiadomo, że źródłem serotoniny w OUN są jądra szwu, w obrębie których wyróżnia się grupę rostralną oraz ogonową [CHARNAY i LEGER 2010, HORNUNG 2010]. Obie grupy wysyłają włókna serotonergiczne do pnia mózgu, lecz dominującą rolę w tworzeniu tego połączenia pełni grupa ogonowa. Grupa rostralna odpowiada za transmisję serotonergiczną docierającą do podwzgórza, hipokampa oraz przyśrodkowej kory przedczołowej [HORNUNG 2010]. Uzyskane wyniki sugerują, że w odpowiedzi na blokowanie aktywności COX-1 oraz COX-2 dochodzi do aktywacji ogonowej grupy jąder szwu. Objawia się to zwiększoną wartością indeksu 5-HIAA/5-HT oraz wyższym stężeniem samego metabolitu serotoniny w obrębie pnia mózgu. Oczywiście, ze względu na równoległe połączenie grupy rostralnej z pniem mózgu nie można wykluczyć jednoczesnej aktywacji tych struktur. Jednakże, jak wcześniej wspomniano grupa rostralna wytwarza wyspecjalizowane połączenia serotonergiczne biegnące do podwzgórza, hipokampa oraz przyśrodkowej kory przedczołowej. Wydaje się, że za argument świadczący o wyższej aktywności grupy rostralnej należy raczej uznać zwiększenie wartości indeksu 5-HIAA/5-HT w obrębie wyżej wymienionych struktur. Co więcej, w odpowiedzi na długotrwałe podawanie obu inhibitorów COX doszło do wzrostu zawartości 5-HIAA w obrębie przyśrodkowej kory przedczołowej. Opisane zjawisko jest bezpośrednio związane ze wzmożonym uwalnianiem serotoniny w obrębie tej struktury. Uzyskane dane neurochemiczne są zgodne z tymi, które zostały przedstawione w badaniach JOHANSSON i współaut. 2012. Badacze wykazali, że blokowanie COX-2 prowadzi do wzmożonego uwalniania serotoniny w przyśrodkowej korze przedczołowej. Zaprezentowane dotychczas informacje, wskazują na silną reakcję układu serotonergicznego, objawiającą się wzmożoną aktywnością ogonowej i prawdopodobnie rostralnej grupy jąder szwu w odpowiedzi na blokowanie COX-1 oraz COX-2.

Wydaje się, że wzrost uwalniania serotoniny w obrębie pnia mózgu i przyśrodkowej kory przedczołowej może być związany z modulacją aktywności 2,3-dioksygenazy indolaminowej (IDO). Wiadomo, że cytokiny prozapalne tj. IL-6 oraz TNF- α aktywują IDO, która katalizuje reakcję przekształcania tryptofanu w kinureninę. Następnie za pośrednictwem kolejnych enzymów, może dojść do przekształcenia kinureniny w kwas chinolinowy lub kwas kinurenowy [FELTES i współaut. 2017]. W naszych badaniach zwierzętom długotrwałe podawano inhibitory COX, które spowodowały obniżenie markerów stanu zapalnego i tym samym prawdopodobny spadek aktywności IDO. W związku z tym faktem, w organizmach zwierząt mogło dojść do osłabienia degradacji tryptofanu, a związek ten mógł zostać wykorzystywany głównie do syntezy serotoniny. Następnie gotowy neuroprzekaznik był magazynowany w ciałach neuronów, co może tłumaczyć wzrost stężenia serotoniny

w obrębie pnia mózgu oraz przyśrodkowej kory przedczołowej (podpunkt „c” Ryc.2 zamieszczona w pracy 2.).

Z kolei, w obrębie hipokampa efekt wywoływany przez długotrwałe blokowanie cyklooksygenaz był odmienny od tego, który obserwowano w pozostałych strukturach OUN. Hipokamp charakteryzuje się występowaniem wielu podtypów receptorów serotoninowych, wywołujących zróżnicowane efekty fizjologiczne oraz charakteryzujących się odmienną ekspresją [DALE i współaut. 2015]. Ze względu na tę szczególną organizację układu serotonergicznego nie jest możliwe jednoznaczne określenie efektu wywoływanego przez obniżenie zawartości serotoniny. Jednakże, można spodziewać się, że długoterminowe blokowanie COX-1 lub COX-2, również podczas stanu zapalnego, wpłynęło na przebieg procesów pamięciowych lub nawet emocjonalnych [CRESPI 2017]. Niektóre badania sugerują, że COX-1 oraz COX-2 i produkty ich aktywności stanowią wymagane komponenty biochemiczne pośredniczące w procesach pamięciowych [TEATHER i współaut. 2002]. Interakcje występujące między aktywnością COX-1 oraz COX-2, a procesami pamięciowymi stanowią ciekawy i nie do końca poznany element badań nad wpływem NLPZ na funkcje poznawcze ssaków.

4.5. Wpływ długotrwałego hamowania aktywności cyklooksygenaz na zachowanie zwierząt w uniesionym labiryncie krzyżowym

Przeprowadzony test EPM miał na celu uzyskanie odpowiedzi na następujące pytanie – „Czy długoterminowe podawanie inhibitorów COX w warunkach septycznych i nieseptycznych doprowadzi do powstania zmian w zachowaniu zwierząt doświadczalnych?”. Za pośrednictwem tego testu sprawdzono następujące zmienne: 1) aktywność lokomotoryczną, 2) poziom lęku i podejmowanie zachowań ryzykownych oraz 3) preferencję do zajmowania określonego miejsca wewnątrz areny testu. Warto zaznaczyć, iż podczas zaburzenia homeostazy organizmu lub trwającej choroby zmienne takie jak: aktywność lokomotoryczna, poziom lęku oraz podejmowanie zachowań ryzykownych podlegają widocznym zmianom [ENGELAND i współaut. 2001, MAES i współaut. 2012]. Efektem zachodzących procesów patofizjologicznych jest indukcja *sickness behaviour*, a następnie zmiana wzorca zachowań. Taka zmiana najczęściej objawia się: zmniejszoną aktywnością lokomotoryczną, wzmożonym lękiem oraz zaniechaniem podejmowania zachowań ryzykownych. Dane uzyskane w teście EPM umożliwiły określenie długotrwałego wpływu inhibitorów COX na wybrane składowe zachowania zwierząt w warunkach septycznych i nieseptycznych. Wpływ ten został opisany w poniższych podrozdziałach.

4.5.1 Hamowanie aktywności szlaku COX-2/PGE2 prowadzi do zwiększonej aktywności lokomotorycznej u szczurów

Oceny aktywności lokomotorycznej dokonano w oparciu o pomiar: przebytego dystansu [cm], prędkości poruszania się [cm/s] oraz ogólnego czasu aktywności [s] zwierząt doświadczalnych. Indukcja eksperymentalnego stanu zapalnego istotnie obniżyła wartość wszystkich badanych

parametrów zachowania. Wspomniany wynik potwierdza fakt, iż w odpowiedzi na dootrzewnowe iniekcje LPS zostaje wygenerowany sygnał, który po dotarciu OUN indukuje *sickness behaviour*, a ten z kolei objawia się obniżoną aktywnością lokomotoryczną. Z drugiej strony, długoterminowe hamowanie aktywności COX-2 spowodowało wzrost wartości badanych parametrów. Sugeruje to, iż celekoksyb może w pewnym sensie stymulować aktywność lokomotoryczną u zwierząt, co mogłoby wskazywać na jego działanie pobudzające. Co więcej, zwierzęta otrzymujące ten inhibitor charakteryzowały się wyższą aktywnością lokomotoryczną niż te, którym podawano SC560. Wcześniejszy rozdział zawiera informacje o tym, że długotrwałe podawanie inhibitorów COX-1 oraz COX-2 powoduje wzrost aktywności układu dopaminergicznego w obrębie pnia mózgu oraz obniża stężenie dopaminy w podwzgórzu. Warto w tym miejscu odnieść się do faktu, iż wzrost aktywności układu dopaminergicznego w pniu mózgu towarzyszy wzmożonej aktywności lokomotorycznej u ssaków [RYCZKO i współaut. 2013, RYCZKO i DUBUC 2017]. Ponadto, oddziaływanie dopaminy na neurony podwzgórza (szczególnie w jego bocznej części) powoduje osłabienie aktywności lokomotorycznej oraz zachowań eksploracyjnych [PARADA i współaut. 1990]. Interesujące, że jedynie w przypadku hamowania aktywności COX-2 zaobserwowano omawiane zmiany behawioralne. Opisane zjawisko może odnosić się do funkcji jakie obie izoformy COX pełnią w organizmie ssaków. Jak wiadomo, COX-1 pełni głównie, lecz nie tylko, rolę „fizjologiczną”, natomiast COX-2 raczej „patofizjologiczną”. Wiadomo również, że w wyniku długotrwałego hamowania aktywności COX-1 dochodzi do zaburzenia homeostazy wielu narządów wewnętrznych. Prawdopodobnie w odpowiedzi na powstałe zaburzenia OUN indukuje *sickness behaviour* lub podobny mechanizm, w celu zmagazynowania energii i przywrócenia homeostazy organizmu [MAES i współaut. 2012]. Jednakże, zmiany aktywności układu dopaminergicznego w obrębie pnia mózgu i podwzgórza wywołane przez hamowanie aktywności COX-2 zapobiegają spadkowi aktywności lokomotorycznej. Prawdopodobnie z tego powodu nie zaobserwowano istotnego spadku ogólnej kondycji ruchowej zwierząt.

4.5.2. Wpływ długoterminowego hamowania aktywności cyklooksygenaz na natężenie poziomu lęku oraz podejmowanie ryzyka

Podczas określania poziomu lęku oraz podejmowania zachowań ryzykownych analizowano czas spędzony przez zwierzęta w otwartych ramionach labiryntu (miejscu potencjalnie niebezpiecznym). Zliczano również liczbę wejść zwierząt do otwartych ramion labiryntu. Nie zaobserwowano wpływu indukcji eksperymentalnego stanu zapalnego oraz hamowania aktywności cyklooksygenaz na czas spędzony w otwartych ramionach labiryntu. Jednakże, w grupie zwierząt otrzymujących celekoksyb odnotowano istotnie większą liczbę wejść do ramion otwartych. Z jednej strony, wyniki mogłyby świadczyć o działaniu przeciwłękowym celekoksybu ponieważ zwierzęta, którym został on podany wykazywały większą chęć eksploracji miejsc potencjalnie niebezpiecznych. Z drugiej strony, większa liczba wejść do ramion otwartych mogła być związana ze wspomnianym wcześniej pobudzającym

działaniem celekoksybu. W tym przypadku nie można otwarcie mówić o przeciwlękowym działaniu celekoksybu ponieważ przedstawione wyniki nie są jednoznaczne. Niemniej jednak opisane wyniki ukazują pewien kierunek zmian, który wskazuje na zależność pomiędzy aktywnością COX-2 a zachowaniem zwierząt.

4.5.3. Preferencja miejsca jako potencjalny wskaźnik zachowań socjalnych

Ustalenia preferencji zwierząt do zajmowania określonego miejsca, dokonano poprzez sporządzenie tzw. „mapy cieplnych”, czyli graficznego przedstawienia lokalizacji osobników na arenie testu EPM. Zaobserwowano, że zwierzęta poddane podskórnym iniekcjom inhibitorów COX lub dootrzewnowym podaniom LPS przebywały w prawym zamkniętym ramieniu labiryntu, natomiast zwierzęta kontrolne w zamkniętym lewym. W celu zaproponowania wyjaśnienia uzyskanych wyników odniesiono się do zmysłu węchu, który jest szczególnie rozwinięty u gryzoni. Oczywiście po każdym wykonanym teście arenę dezynfekowano, aby usunąć zapachy wcześniejszych osobników. Jednak, ze względu na wysoce rozwinięty zmysł węchu u szczurów nie można wykluczyć sytuacji, w której odbierałyby one pozostałości sygnałów zapachowych. Dla zwierząt zapachy są ważnym źródłem informacji związanych m. in. z ryzykiem potencjalnej infekcji [OTTO i współaut. 2015]. Zakładam, że zwierzęta mogły rozpoznawać i unikać miejsc, w których przebywały potencjalnie zakażone osobniki [KAVALIERS i współaut. 2020]. Odnosi się to, do tzw. „patogennego wstrętu”, który polega na unikaniu osobników generujących sygnały zapachowe związane z patogenami, zanieczyszczeniami lub toksynami [KAVALIERS i współaut. 2019].

W przypadku izolacji zwierząt kontrolnych od tych, które otrzymywały celekoksyby lub SC560 ponownie odniosę się do negatywnego wpływu inhibitorów cyklooksygenaz na homeostazę narządów wewnętrznych zlokalizowanych na obwodzie organizmu. Jak wcześniej wspomniano, długotrwała inhibicja aktywności COX-1 prowadzi do powstawania zaburzeń homeostazy wielu narządów wewnętrznych (np. nerek). Z kolei, długotrwałe hamowanie aktywności COX-2 może również doprowadzić do wystąpienia skutków ubocznych dotykających narządy wewnętrzne. Potwierdzeniem tego faktu jest historia leku Vioxx, inhibitora COX-2, który wykazuje szkodliwe działanie m. in. w stosunku do nerek oraz układu sercowo-naczyniowego [GISLASON i współaut. 2006]. Zaproponowana hipoteza, która wyjaśniałaby unikanie osobników z zachwianą homeostazą narządów wewnętrznych odnosi się do zmiany składu głównych białek moczu (ang. *major urinary proteins*, MUPs). W związku z tym, że stosowanie inhibitorów COX wpływa na fizjologię nerek i prawdopodobnie skład produkowanego moczu, zwierzęta kontrolne oraz te poddane procedurom eksperymentalnym mogą charakteryzować się odmiennym składem MUPs [KAVALIERS i współaut. 2019]. W efekcie tego, zmieniony ilościowo lub jakościowo skład MUPs mógł zostać odebrany przez zwierzęta „zdrowe” jako sygnał do izolacji.

4.6. Wpływ długoterminowego podawania inhibitorów cyklooksygenaz na aktywność aminokwasowych układów neurotransmisyjnych w wybranych strukturach OUN

Podczas badania neurotransmisji aminokwasowej oznaczano stężenie: asparagianinu, glutaminianu, glicyny, kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) oraz prekursorów neuroprzekazników tj. tyrozyny i tryptofanu. Struktury OUN, w których badano zawartości powyższych aminokwasów stanowiły: ciało migdałowe, pień mózgu, hipokamp, podwzgórze oraz istotę szarą okołowodociągową. W prezentowanej części doświadczenia wykorzystywano materiał biologiczny pochodzący od zwierząt: kontrolnych oraz otrzymujących celekoksyl lub SC560. Badane struktury OUN pobrano również od zwierząt otrzymujących jeden z inhibitorów cyklooksygenazy, w warunkach septycznych oraz nieseptycznych. Celem ułatwienia czytelnikowi odbioru pracy dane zawarte w tym rozdziale zostały opisane w sposób odmienny niż, te które odnosiły się do monoaminergicznych układów neurotransmisyjnych. Ze względu na dużą liczbę analizowanych zmiennych, dane przedstawiono jako zmiany zawartości badanych aminokwasów w obrębie określonych struktur OUN.

4.6.1. Zmiany zawartości aminokwasów w ciele migdałowatym podczas blokowania aktywności cyklooksygenaz

Przeprowadzone analizy neurochemiczne wykazały, iż blokowanie aktywności COX-1 u zwierząt „zdrowych” spowodowało wzrost zawartości asparagianinu w ciele migdałowatym. Jednakowy efekt został wywołany przez hamowanie aktywności COX-2 i występował on niezależnie od wywołania stanu zapalnego. Zwierzęta, u których blokowano COX-2 charakteryzowały się wyższym stężeniem asparagianinu w ciele migdałowatym niż te, u których hamowano aktywność COX-1. Iniekcja inhibitora COX-1 i LPS doprowadziła do osiągnięcia wyższego stężenia asparagianinu w ciele migdałowatym zwierząt, w porównaniu do podawania samego inhibitora. Jedyna różnica w aktywności układu glutaminergicznego występowała pomiędzy zwierzętami otrzymującymi odpowiednio inhibitor COX-1 i COX-2 w warunkach nieseptycznych. W przypadku blokowania aktywności COX-1 obserwowano wyższe stężenie glutaminianu w obrębie ciała migdałowatego.

Ciało migdałowe jest rozbudowaną, niejednorodną strukturą, której udział w przebiegu procesów emocjonalnych jest dobrze znany. Zazwyczaj jest ono kojarzone z indukcją negatywnych emocji np. warunkowaniem strachu [SONG i współaut. 2017]. Mimo to, jego rola w generowaniu emocji przeciwnych została zbadana i potwierdzona. Ciało migdałowe uczestniczy w określaniu działania, które należy podjąć w odpowiedzi na oddziałujący na organizm bodziec. Pośredniczy ono również w podejmowaniu decyzji uwzględniających zysk lub stratę dla organizmu. Jego aktywacja ma kluczowe znaczenie podczas przetwarzania przez OUN stresujących wydarzeń [RANGEL i współaut. 2008, SONG i współaut. 2017, PESSOA 2021]. Ciało migdałowe otrzymuje sygnały z wielu korowych i podkorowych obszarów mózgu. Ma to miejsce za pośrednictwem wiązek włókien

m. in. prążka krańcowego, szlaku brzuszego ciała migdałowatego lub bocznego pęczka węchowego [ŠIMIĆ i współaut. 2021]. Wzmoczona aktywność układu glutaminergicznego w podstawnej części ciała migdałowatego pełni istotną rolę w jego aktywacji podczas sytuacji stresowych doświadczanych przez organizm zwierzęcy. Takie zjawisko zostało zaobserwowane u szczurów w odpowiedzi na oddziaływanie stresu ostrego [SONG i współaut. 2017]. Jednakże, w przeprowadzonym doświadczeniu, wpływ procedur eksperymentalnych na aktywność układu glutaminergicznego w ciele migdałowatym nie został odnotowany. Wykazano jednak istotny wpływ hamowania aktywności cyklooksygenaz, szczególnie COX-2, na zawartość asparaginianu. Warto zaznaczyć, iż niektórzy autorzy uważają, że asparaginian pełni rolę regulacyjną względem układu glutaminergicznego [DALANGIN i współaut. 2020, USIELLO i współaut. 2020]. Należy również wspomnieć o fakcie, iż asparaginian jest strukturalnie podobny do glutaminianu oraz posiada zdolność do aktywacji receptora N-metylo-asparaginianu (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*, NMDA). Uzyskane dane pokazują, iż bodźce stresowe będące odpowiedzią na wykonywane iniekcje, mogące prowadzić do „wyłączenia” drogi humoralnej oraz potencjalnego zaburzenia homeostazy narządów wewnętrznych aktywowały ciało migdałowate. Jednakże, we wspomnianej aktywacji nie pośredniczył typowy pobudzający neuroprzebieżnik aminokwasowy – glutaminian, lecz asparaginian, związek którego nazywane neuroprzebieżnikiem wciąż może budzić kontrowersje [DALANGIN i współaut. 2020]. Wynik ten sugerowałby, że w odpowiedzi na przewlekły stres dochodzi do odmiennej aktywacji ciała migdałowatego niż w przypadku reakcji na stres ostry.

Wahania stężenia tyrozyny wśród neuronów tworzących ciało migdałowate mogą być związane z warunkowaniem strachu i odpowiedzią organizmu na stres. Jak już wspomniano, podczas trwającego na obwodzie organizmu stanu zapalnego może dochodzić do indukcji *sickness behaviour*. Ponadto, długotrwałe blokowanie COX-1 może przyczynić się do zaburzenia właściwego funkcjonowania narządów wewnętrznych. Każde z tych zdarzeń może prowadzić do odczuwania stresu przez organizm ssaka. Natomiast w sytuacji, gdy występują one jednocześnie stanowią silny bodziec stresowy odbierany przez ciało migdałowate. Wiadomo, iż uwalnianie katecholamin (np. noradrenaliny) jest tzw. „środkiem zaradczym na stres”, co w tym przypadku mogłoby być związane z naruszeniem rezerw tyrozyny w obrębie ciała migdałowatego [ANDOLINA i BORRECA 2017]. Z drugiej strony, w ciele migdałowatym zwierząt otrzymujących SC560 w warunkach septycznych odnotowano efekt, który świadczyłby o zmniejszonym odczuwaniu stresu. Według SKÓRZEWSKIEJ i współaut. 2015, hiperaktywności ciała migdałowatego rejestrowanej podczas stresu towarzyszy osłabienie otrzymywanej projekcji GABA-ergiczej. Wskazuje to na kluczową rolę układu GABA-ergicznego w utrzymaniu odporności organizmu na bodźce stresowe [SKÓRZEWSKA i współaut. 2015, ZHANG i współaut. 2018]. W ciele migdałowatym zwierząt otrzymujących SC560 w warunkach septycznych i nieseptycznych odnotowano wzrost stężenia GABA. Niestety ze względu na przeciwstawny charakter otrzymanych wyników (spadek stężenia tyrozyny – stres vs wzrost stężenia GABA – ograniczenie odczuwania stresu), wpływ SC560 na procesy emocjonalne generowane przez ciało migdałowate pozostaje dyskusyjny.

4.6.2. Modyfikacja zawartości aminokwasów w pniu mózgu jako efekt długotrwałego podawania inhibitorów COX

Początkowo glicyna była uznawana za neurotransmitter hamujący występujący w głównie interneuronach rdzenia kręgowego i pnia mózgu. Funkcja glicyny odnosiła się głównie do regulacji procesów związanych z szeroko pojętą aktywnością lokomotoryczną [WHEELER i współaut. 1999, DE BARTOLOMEIS i współaut. 2020]. Jednakże wraz z postępującym rozwojem nauki, „rzucano więcej światła” na strukturę i fizjologię układu glicynergicznego. Okazuje się, że glicyna nie wykazuje jedynie działania hamującego lecz może stymulować neurony za pośrednictwem ułatwiania aktywacji receptora NMDA przez glutaminian [PARSONS i współaut. 1998, ZHURAVLEVA i współaut. 2015]. Zbadano, iż elementy tego układu są zlokalizowane w strukturach biorących udział w procesie komunikacji nerwowo-odpornościowej. Obecność neuronów glicynergicznych potwierdzono w strukturach pnia mózgu, do których zalicza się m. in. pole najdalsze (ang. *area postrema*, AP) oraz jądro dwuznaczne (ang. *ambiguus nucleus*, AMB) [RAMPON i współaut. 1996, EZURE i współaut. 2003]. Wiadomo, iż AP należy do narządów okołokomorowych, znanych ze swoich funkcji immunosensorycznych. Jest ono dwukierunkowo połączone z jądrem pasma samotnego oraz otrzymuje sygnały trzewne generowane przez nerw błędny. Posiada również projekcję wstępującą pochodzącą z jądra przykomorowego podwzgórza – PVN [BENARROCH 2011]. W przypadku AMB należy wspomnieć o jego przynależności do grupy jąder nerwu błędnego, a zatem do struktur OUN, które są doskonale znane ze swojego udziału w procesach neuroimmunomodulacyjnych. Pobudzenie neuronów AMB może prowadzić do wzrostu impulsacji w obrębie włókien eferentnych nerwu błędnego [MEI i współaut. 2008]. Następnie wygenerowane pobudzenie może oddziaływać na jeden z centralnych elementów układu limfatycznego czyli grasnicę. Efektem tego oddziaływania może być wzrost proliferacji limfocytów i produkcji cytokin prozapalnych przez ten narząd [NIJIMA 1995, MEI i współaut. 2008].

Należy również wspomnieć o fakcie, iż w odpowiedzi na blokowanie cyklooksygenaz doszło do zwiększenia stężenia GABA w pniu mózgu zwierząt eksperymentalnych. Powszechnie wiadomo, iż GABA jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym w OUN [WU i współaut. 2017]. Oznacza to, że w wyniku wzrostu jego stężenia w obrębie pnia mózgu może dochodzić do obniżenia aktywności neuronów tej struktury. Z drugiej strony, zwiększone stężenie GABA w obrębie pnia mózgu może być powiązane ze szczególną odpowiedzią behawioralną zwierząt. Jak opisują PARE i DUVARCI 2012 projekcja GABA-ergiczna z centralnego jądra migdałowatego do pnia mózgu może inicjować reakcję strachu.

Podsumowując, pień mózgu zawiera struktury mogące wpływać na aktywność nerwu błędnego, są nimi AP oraz AMB. Z racji tego, wspomniane struktury można uznać za elementy neuronalnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej. W przeprowadzonym doświadczeniu zbadano, iż blokowanie aktywności COX-1 lub COX-2 prowadzi do wzrostu stężenia glicyny oraz GABA w pniu mózgu. Założyliśmy, iż długoterminowe blokowanie COX-1 lub COX-2 uruchomiło mechanizmy kompensujące zaburzenia humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej. Uruchomione w ten sposób mechanizmy objawiałyby

się przejściem przez drogę neuronalną dominującej roli w komunikacji pomiędzy układem odpornościowym a OUN. Wydaje się, że w efekcie uruchomienia mechanizmów kompensujących doszło do aktywacji układu glicynergicznego w obrębie struktur OUN modulujących aktywność nerwu błędnego. W związku z tym, iż glicyna stymuluje aktywność neuronów za pośrednictwem ułatwiania aktywacji receptorów NMDA przez glutaminian, można przypuszczać, że wywarła ona taki efekt w stosunku do neuronów AP oraz AMB. Jest to szczególnie ważne w sytuacji zaburzenia aktywności humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej. Zakładamy, że stymulacja struktur OUN wpływających na aktywność nerwu błędnego lub jego ośrodkowych elementów spowodowała wzrost jego aktywności, która objawiała się wzmożoną impulsacją odśrodkową oraz dośrodkową. Wydaje się, że w wyniku uruchomionych mechanizmów kompensujących, organizm zwierzęcia w dalszym ciągu mógł właściwie kontrolować przebieg procesów immunosensorycznych oraz immunomodulacyjnych.

Niezależnie od zmian aktywności układu glicynergicznego, w obrębie pnia mózgu doszło również do zwiększenia stężenia GABA. Prawdopodobnie opisywana zmiana zawartości neuroprzekaźnika była efektem wzmożonej transmisji GABA-ergicznej z ciała migdałowatego. Jak wcześniej wspomniano, wzrost zawartości GABA w analizowanej strukturze OUN jest związany z odczuwaniem przez zwierzęta strachu [PARE i DUVARCI 2012]. Wiadomo, że silna reakcja emocjonalna może doprowadzić do indukcji behawioralnych reakcji obronnych tj. reakcja walki, ucieczki lub znieruchomienia. Przedstawione informacje oraz wyniki badań, sugerują, że organizm zwierzęcia z zaburzoną aktywnością drogi humoralnej nie „inwestuje” jedynie w pełni sprawną drogę neuronalną lecz równolegle aktywuje kolejne mechanizmy mające na celu jego ochronę.

4.6.3. Profil aminokwasowy hipokampa i zaburzenie aktywności szlaku COX-1 oraz COX-2/PGE2

Hipokamp jest złożoną strukturą kresomózgowia posiadającą liczne projekcje wstępujące i zstępujące. Wraz z korą śródwęchową i zakrętem zębatym tworzy tzw. „formację hipokampa”. Pełni on kluczową rolę w: tworzeniu engramów pamięciowych, przebiegu procesów poznawczych oraz orientacji zwierzęcia w przestrzeni [LISMAN i współaut. 2017]. Jest ważnym elementem układu limbicznego, a jego aktywność ma istotne znaczenie podczas przetwarzania emocji [ZHU i współaut. 2019]. Analiza chromatograficzna profilu aminokwasowego hipokampa ujawniła istotne zmiany neurochemiczne w tej strukturze w odpowiedzi na blokowanie aktywności COX-1 lub COX-2 w warunkach septycznych i nieseptycznych.

Podczas analizy chromatograficznej neurotransmitterów zaobserwowano istotny spadek zawartości asparagianinu w odpowiedzi na podawanie celekoksybu, niezależnie od stanu zapalnego i SC560 u zwierząt z eksperymentalnie wywołanym stanem zapalnym. Niezależnie od stanu zapalnego, podawanie zwierzętom SC560 prowadziło do silniejszego wzrostu stężenia asparagianinu w hipokampie, niż miało to miejsce podczas podawania celekoksybu. Jednocześnie odnotowano spadek stężenia glutaminianu w odpowiedzi

na iniekcje celekoksybu u zwierząt z wywołanym stanem zapalnym. Ponadto, podawanie SC560 zwierzętom ze stanem zapalnym lub bez niego, prowadziło do obniżenia stężenia glutaminianu w hipokampie. Iniekcje celekoksybu z jednoczesnym wytworzeniem stanu zapalnego, stanowiły najsilniejszy bodziec obniżający stężenie glutaminianu w obrębie tego obszaru OUN.

Dane literaturowe sugerują, że podczas działania na organizm zwierzęcia stresorów (np. infekcji), dochodzi do wzrostu stężenia PGE2 w mózgu [MINGHETTI i współaut. 2000, XIAO i współaut. 2018]. Wspomniany wzrost PGE2 występujący w obrębie hipokampa może upośledzać funkcje pamięciowe oraz poznawcze [XIAO i współaut. 2018]. Jednakże, badania przeprowadzone przez RALL i współaut. 2003 pokazują, że aktywność COX-2 w tym obszarze mózgu gryzoni jest niezbędna dla właściwego przebiegu procesów pamięciowych. Wiele dowodów wskazuje również na to, że glutaminian, za pośrednictwem receptorów NMDA, wykazuje niezwykle istotny wpływ na procesy zachodzące w hipokampie. Około 90% komórek tej struktury to neurony glutaminergiczne [XIAO i współaut. 2018, BRIEND i współaut. 2020]. Warto ponownie nadmienić, iż receptory NMDA mogą zostać aktywowane również przez asparaginian i pobudzać neurony w sposób podobny do glutaminianu [DALANGIN i współaut. 2020]. Wskazywałoby to na podobieństwo co do roli odgrywanej przez oba związki w obrębie hipokampa. Uzyskane dane są zgodne z tymi, które opublikowali RALL i współaut. 2003 oraz BRIEND i współaut. 2020. W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano, że długoterminowe blokowanie COX-2 oddziałuje na fizjologię hipokampa, skutkując obniżeniem zawartości glutaminianu i asparaginianu. Z dużym prawdopodobieństwem można założyć, iż obniżenie wartości badanych parametrów spowodowało pogorszenie zdolności poznawczych. Co więcej, bodźcem najsilniej obniżającym stężenie tych aminokwasów była iniekcja LPS podczas długotrwałego blokowania COX-2. Przedstawione wyniki sugerują istotną rolę COX-2 w prawidłowym funkcjonowaniu układu glutaminergicznego hipokampa oraz opisują niekorzystny wpływ stanu zapalnego na zdolności poznawcze ssaków. Warto nadmienić, iż dane literaturowe potwierdzają szczególną relację występującą między układem glutaminergicznym i zdolnościami poznawczymi zwierząt. Ponadto, niektórzy badawcy sugerują, iż zdolności te mogą być w pewnym stopniu zależne od stężenia asparaginianu [RALL i współaut. 2003, BRIEND i współaut. 2020].

Blokowanie aktywności COX-1 spowodowało wzrost stężenia glicyny oraz GABA w hipokampie zwierząt, które nie otrzymały iniekcji LPS. Odnotowano, iż blokowanie aktywności COX-1, w porównaniu do blokowania COX-2, prowadzi do uzyskania przez zwierzęta „zdrowe” wyższego stężenia glicyny oraz GABA w hipokampie. Zaobserwowano również, że indukowanie stanu zapalnego u zwierząt, którym podawano SC560, stanowiło bodziec obniżający stężenie glicyny w tym obszarze OUN. Niezależnie od stanu zapalnego, długotrwałe podawanie celekoksybu powodowało istotne obniżenie stężenia GABA w hipokampie. Czynnikiem najsilniej obniżającym zawartość GABA było podawanie celekoksybu wraz z wywołaniem u zwierząt eksperymentalnego stanu zapalnego. Wykazano również, że indukcja eksperymentalnego stanu zapalnego podczas

blokowania aktywności COX-1 prowadzi do obniżenia stężenia GABA w badanej strukturze mózgu.

Przedstawione wyniki sugerują, że hamowanie aktywności COX-1 oraz COX-2 wpływa odmiennie na aktywność układu GABA-ergicznego i glicynergicznego w hipokampie. Liczne dane, uzyskane przez innych autorów wskazują na istotną rolę wspomnianych układów neurotransmisyjnych w przebiegu procesów poznawczych hipokampa [PONTES i współaut. 2013, LI i współaut. 2020]. Przyjęcie stężeń GABA i glicyny jako umownych „wskaźników efektywności procesów poznawczych” umożliwiłoby sformułowanie następujących wniosków:

- blokowanie aktywności COX-1 może wywierać potencjalnie pozytywny wpływ na procesy poznawcze zachodzące w hipokampie poprzez zwiększanie zawartości GABA oraz glicyny;
- hamowanie aktywności COX-2 prowadzi do obniżenia stężenia GABA i potencjalnych ubytków poznawczych.

Wiadomo, że aktywność COX-2, ale również stres, to czynniki wpływające na funkcjonowanie hipokampa [KIM i DIAMOND 2002, RALL i współaut. 2003]. Wydaje się, że długotrwałe blokowanie aktywności COX-2 oraz iniekcja LPS stanowiły silne bodźce stresowe dla badanych zwierząt. Stres może oddziaływać na hipokamp za pośrednictwem glikokortykoidów i specyficznych dla nich receptorów. Ponadto, podczas negatywnego oddziaływania stresu na ten obszar OUN obserwuje się wzmożoną aktywację ciała migdałowego [SKÓRZEWSKA i współaut. 2015, ZHANG i współaut. 2018]. W obecnym doświadczeniu wykazano istotną aktywację ciała migdałowego, wyrażoną wzrostem stężenia asparagianu, w odpowiedzi na blokowanie COX-2 i iniekcję LPS. Uważam, że wyniki oraz założenia przedstawione w niniejszym rozdziale ukazują raczej kierunek dalszych badań (np. behawioralnych) niż szczegółowo określają wpływ inhibitorów COX na neurochemię hipokampa oraz procesy zachodzące za jego pośrednictwem. Nie zmienia to jednak faktu, iż wpływ blokowania cyklooksygenaz w warunkach septycznych i nieseptycznych na aktywność układów neurotransmisyjnych tego obszaru OUN został jednoznacznie potwierdzony.

Analiza chromatograficzna zawartości prekursorów neuroprzekaźników monoaminergicznych tj. tyrozyny oraz tryptofanu, w hipokampie wykazała istotne zmiany. Zaobserwowano, że indukcja stanu zapalnego i długotrwałe podawanie SC560 spowodowało spadek stężenia tryptofanu. Stężenie tyrozyny i tryptofanu było wyższe u zwierząt „chorych”, które były poddane iniekcjom celekoksylu, niż u tych, które otrzymywały SC560. Indukcja stanu zapalnego podczas długoterminowego hamowania aktywności COX-1 powodowała spadek stężenia tyrozyny w analizowanej strukturze.

Obserwowany spadek zawartości tryptofanu w hipokampie zwierząt „chorych” i otrzymujących SC560 jest prawdopodobnym skutkiem aktywacjiIDO. Enzym ten zostaje aktywowany przez związki prozapalne, uwalnianie w odpowiedzi na iniekcję LPS. Następnie w szeregu reakcji chemicznych (szlak kinureninowy) dochodzi do przekształcenia tryptofanu w kinureninę, a następnie w kwas chinolinowy lub kwas kinurenowy

[FELTES i współaut. 2017]. W związku z uruchomieniem opisywanego szlaku może dochodzić do obniżenia zawartości tryptofanu w hipokampie. Dane dotyczące monoaminergicznych układów neurotransmisyjnych również potwierdzają to założenie. Odnotowano, iż u zwierząt iniekcja LPS podczas długotrwałego podawania SC560, spowodowała spadek stężenia serotoniny w tym obszarze OUN. Przedstawione dane pokazują, że długotrwałe blokowanie aktywności COX-1 nie jest w stanie zapobiec transmisji sygnału prozapalnego, generowanego w odpowiedzi na obwodową infekcję. Z drugiej strony, w hipokampach zwierząt otrzymujących celekoksyb, u których wywołano stan zapalny, obserwowano wyższe stężenie tryptofanu niż w przypadku tych, które otrzymywały SC560. Wynik ten może sugerować, że hamowanie aktywności COX-2, podczas infekcji obwodowej, może sprzyjać odpowiedniemu funkcjonowaniu układu serotonergicznego w hipokampie. Niestety, jak opisywano we wcześniejszych rozdziałach, hamowanie aktywności COX-2 może wpływać również negatywnie na procesy zachodzące w hipokampie.

4.6.4. Wpływ długoterminowego blokowania aktywności cyklooksygenaz na zawartość aminokwasów w podwzgórzu

Podwzgórze stanowi strukturę OUN, której złożoność nie polega jedynie na specyficznej morfologii, lecz również na różnorodności procesów przez nią regulowanych. Składa się ze zbioru jąder zlokalizowanych w brzusznej części międzymózgowia. Stanowi ośrodek regulujący: aktywność układu autonomicznego, pracę gruczołów hormonalnych, gospodarkę wodno-elektrolitową, rytm dobowy, temperaturę ciała, a nawet zachowanie zwierząt [BEAR i współaut. 2018, SHAHID i współaut. 2022]. W prezentowanym doświadczeniu skupiono się jednak na udziale podwzgórza w przebiegu procesów: immunosensorycznych (odbieranie sygnału pirogenego), immunomodulacyjnych (wpływ na oś HPA) oraz tych, związanych z indukcją zachowań towarzyszących chorobie (*sickness behaviour*).

Analiza stężenia glutaminianu w podwzgórzu wykazała, że blokowanie aktywności COX-1, niezależnie od stanu zapalnego, oraz COX-2 w warunkach nieseptycznych, wywołuje taki sam efekt, tj. spadek stężenia analizowanego aminokwasu. Jednakże, oczekiwany spadek stężenia glutaminianu w odpowiedzi na iniekcje LPS był blokowany przez długoterminowe podawanie zwierzętom celekoksybu.

Dane uzyskane i opisane przez innych autorów sugerują, że glutaminian, szczególnie w podstawno-przyśrodkowej części podwzgórza, odpowiada za regulację bilansu energetycznego poprzez kontrolę przyjmowania pokarmu [GUYENET i współaut. 2013]. Dowiedziono również, że hamowanie aktywności układu glutaminergicznego za pośrednictwem antagonistów receptora NMDA hamuje pobieranie pokarmu [DELGADO 2013]. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż podczas infekcji lub choroby organizmu dochodzi do zmniejszenia pobierania pokarmu czyli uruchomienia jednego z głównych mechanizmów składających się na *sickness behaviour*. W świetle przedstawionych informacji, obniżenie stężenia glutaminianu w podwzgórzu zwierząt, które otrzymały iniekcję LPS stanowiło skutek przewidywalny. Jednakże, przyczyna obniżenia wartości badanego parametru

u „zdrowych” zwierząt, otrzymujących inhibitory COX-1 lub COX-2, pozostaje niejasna. Zakładam, że długoterminowe podawanie inhibitorów spowodowało takie zaburzenie homeostazy narządów wewnętrznych, które zostało zdefiniowane przez organizm jako choroba [BINDU i współaut. 2020]. Warto również zwrócić uwagę na siłę z jaką oba inhibitory COX obniżały stężenie glutamianu. Zwierzęta otrzymujące inhibitor COX-1 wykazywały niższe stężenie glutamianu w podwzgórzu, niż te, które przyjmowały inhibitor COX-2. Wydaje się, że zaburzenie homeostazy narządów wewnętrznych spowodowane blokowaniem aktywności COX-1 stanowiło dla OUN zwierząt silniejszy bodziec. Na tym tle, iniekcja LPS istotnie obniżała stężenie glutamianu w podwzgórzu, lecz podczas długotrwałego blokowania COX-2 nie doprowadzała do gwałtowniejszego spadku wartości badanego parametru. Przedstawione wyniki mogą potwierdzać dawny pogląd zakładający, że COX-1 pełni głównie funkcje „homeostatyczne” natomiast COX-2 raczej „patofizjologiczne”. Jednakże, na chwilę obecną wiemy, że popularne niegdyś założenie nie jest do końca prawidłowe ponieważ obie izoformy COX pełnią funkcje homeostatyczne w podobnym stopniu [ZIDAR i współaut. 2009].

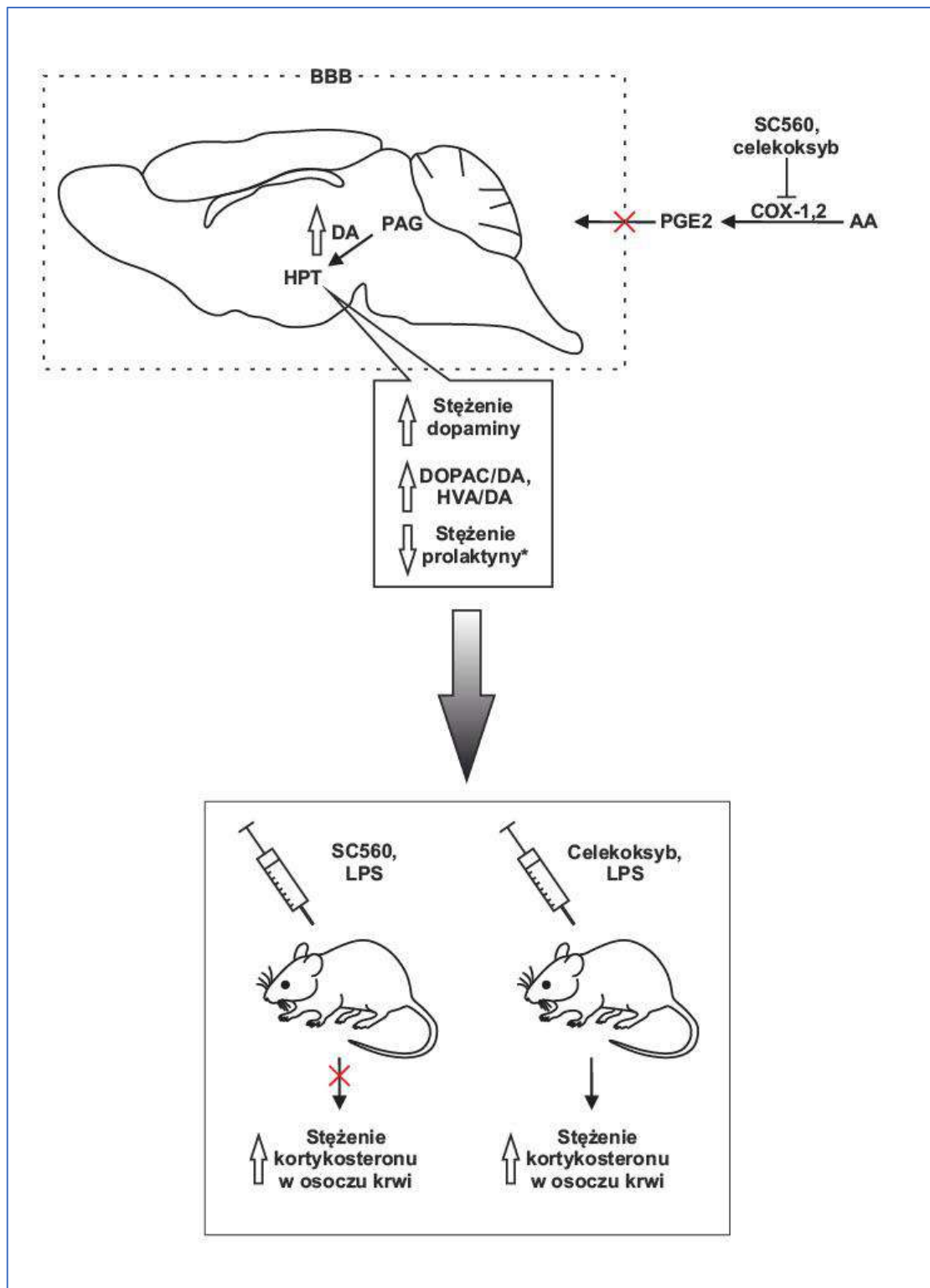
Dalsza analiza stężenia aminokwasów w podwzgórzu ujawniła, że długotrwałe stosowanie SC560 prowadzi do obniżenia stężenia glicyny oraz GABA niezależnie od stanu zapalnego. Wielokrotne podawanie celekoksylu również obniżało zawartość glicyny niezależnie od stanu zapalnego. Jednakże, do obniżenia stężenia GABA przez celekoksyl dochodziło jedynie w warunkach nieseptycznych. Mimo to, osobniki otrzymujące celekoksyl wykazywały wyższe stężenie GABA, niż te, którym podawano SC560, również podczas stanu zapalnego.

Badania morfologiczne potwierdzają lokalizację neuronów GABA-ergicznymi głównie w bocznej oraz grzbietowo-przyśrodkowej części podwzgórza. Rola wskazanych neuronów odnosi się do kontrolowania bilansu energetycznego organizmu czyli działań związanych z pobieraniem pokarmu [SUYAMA i YADA 2018]. Warto nadmienić, iż egzogenne podawanie GABA do tzw. „ośrodku żywienia” w podwzgórzu promuje przyjmowanie pokarmu u ssaków [SUYAMA i YADA 2018]. W prezentowanym badaniu odnotowano spadek stężenia GABA, który może świadczyć o indukcji *sickness behaviour*, objawiającej się obniżeniem pobierania pokarmu. Opublikowane dane wskazują również na fakt, iż do elementów składowych podwzgórza, w tym do pola przedwzrokowego, docierają włókna glicynergiczne [RAMPON i współaut. 1996]. Eksperyment przeprowadzony przez ZHURAVLEVA i współaut. 2015 jednoznacznie wskazuje, iż glicyna oddziałuje na pole przedwzrokowe podwzgórza indukując zachowania seksualne. Ponadto, badania prowadzone na gryzoniach sugerują, iż *sickness behaviour* rozwijający się w odpowiedzi na iniekcję LPS oddziałuje również na aktywność seksualną zwierząt [MELLO i współaut. 2018]. Rozpatrując spadek stężenia glicyny jako przyczynę ograniczenia zachowań seksualnych można zakładać, iż stosowanie inhibitorów COX uruchomiło kolejny mechanizm chorobowy mający na celu ograniczenie wydatku energetycznego.

Na podstawie danych pochodzących z analizy chromatograficznej zawartości tyrozyny i tryptofanu w podwzgórzu zwierząt zaobserwowano istotne zmiany będące odpowiedzią na wykonane procedury eksperymentalne. Wielokrotne podawanie SC560, niezależnie od stanu

zapalnego, zwiększało stężenie tyrozyny w badanej strukturze. Ponadto, stężenie tyrozyny u tych zwierząt było wyższe niż u osobników otrzymujących celekoksyb w warunkach septycznych i nieseptycznych. Z drugiej strony, długotrwałe podawanie SC560 obniżało stężenie tryptofanu w podwzgórzu niezależnie od stanu zapalnego. Celekoksyb podawany w sposób długotrwały w warunkach nieseptycznych również powodował obniżenie stężenia tryptofanu. Mimo to, zwierzęta „chore”, które otrzymywały celekoksyb, charakteryzowały się wyższym stężeniem tryptofanu w podwzgórzu, niż zwierzęta „zdrowe” otrzymujące ten sam związek.

Wyniki dotyczące zawartości aminokwasowego prekursora katecholamin – tyrozyny, są komplementarne do tych, które uzyskano podczas analizy stężenia dopaminy. Warto nadmienić, iż długotrwałe blokowanie aktywności cyklooksygenaz, niezależnie od stanu zapalnego, powodowało obniżenie stężenia dopaminy w podwzgórzu. Ponadto, zaobserwowano, iż w odpowiedzi na blokowanie aktywności cyklooksygenaz doszło do intensyfikacji zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowego metabolizmu dopaminy w obrębie podwzgórza. Uzyskane dane jednoznacznie pokazują, że hamowanie aktywności cyklooksygenaz, głównie COX-1, skutkuje wzrostem aktywności układu dopaminergicznego w podwzgórzu oraz formowaniem wewnątrzneuralnych rezerw tyrozyny. Jak powszechnie wiadomo, dopamina hamuje produkcję prolaktyny, która wykazuje działanie przeciwstresowe modulując aktywność osi HPA [GUSTAFSON i współaut. 2017]. W związku z tym, zablokowanie przez prolaktynę wzrostu aktywności osi HPA, wydzielania kortykosteronu, i w efekcie brak odpowiedzi na iniekcję LPS, u zwierząt otrzymujących SC560 stanowiło efekt wielce prawdopodobny. Jednakże w związku z tym, iż aktywność osi HPA może być regulowana przez wiele czynników nie ma możliwości jednoznacznego stwierdzenia czy podwyższona zawartość tego hormonu zapobiegła wzrostowi stężenia kortykosteronu w osoczu krwi. Pomimo tego, iż COX-1 nie jest uważana za główny enzym odpowiedzialny za transmisję sygnału prozapalnego do OUN to jednak jego zablokowanie osłabiło odpowiedź osi HPA. Wydaje się, że podczas blokowania aktywności COX-2 doszło do indukcji potencjalnych mechanizmów kompensujących zaburzenie humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej. Niezależnie od faktu, iż blokowanie COX-2 obniżyło stężenie dopaminy i prawdopodobnie zwiększyło stężenie prolaktyny, to odpowiedź osi HPA na iniekcję LPS została odnotowana choćby przez wzrost stężenia kortykosteronu w osoczu krwi zwierząt. Jednakże mechanizmy odpowiedzialne za aktywację osi HPA podczas blokowania COX-2 pozostają obecnie niejasne. Niemniej jednak można przypuszczać, iż w tym przypadku mogą się one odnosić do szczególnej roli prolaktyny.



Ryc. 1. SC560 i celekoksyb wywołują odmienny efekt w stosunku do wydzielania kortykosteronu pomimo jednakowego wpływu na układ dopaminergiczny w podwzgórzu – indukcja potencjalnych mechanizmów kompensujących zaburzenie humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej podczas podawania zwierzętom celekoksybu (inhibitora COX-2). Lista skrótów: COX-1,2 – cyklooksygenaza 1 lub 2, PAG – istota szara okółowodociągowa, HPT – podwzgórze, DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy, HVA – kwas homowanilinowy, DA – dopamina, LPS – lipopolisacharyd. * - potencjalny wzrost stężenia prolaktyny w odpowiedzi na spadek stężenia dopaminy [na podstawie GUSTAFSON i współaut. 2017].

Uzyskane dane, opisujące zawartość tryptofanu oraz aktywność układu serotonergicznego (stosunek 5-HIAA/5-HT) w podwzgórzu są w stosunku do siebie komplementarne. Zaobserwowano, iż hamowanie obu izoform COX obniża stężenie tryptofanu z jednoczesnym zwiększeniem wartości indeksu 5-HIAA/5-HT. Zarówno dane z piśmiennictwa jak też wyniki dotyczące stężenia cytokin prozapalnych w osoczu krwi zwierząt pokazują, że podawanie inhibitorów COX skutkuje obniżeniem stężenia związków prozapalnych [LISBOA i współaut. 2017]. Jak wcześniej wspomniano, metabolizm tryptofanu w OUN podlega silnym wpływom procesów immunologicznych, jak choćby aktywacjaIDO przez cytokiny prozapalne. Warto nadmienić, iż efektem aktywacjiIDO jest zmiana metabolizmu tryptofanu w kierunku szlaku kynureninowego i tym samym spadek stężenia serotoniny [HÖGLUND i współaut. 2019]. Wydaje się, że u zwierząt otrzymujących inhibitory COX nie doszło do uszczuplenia rezerw tryptofanu w wyniku zmiany kierunku jego metabolizmu. W związku z ograniczeniem uwalniania cytokin prozapalnych przez inhibitory COX, uważamy, że obniżenie zawartości tryptofanu wynikało z intensywniejszej syntezy serotoniny spowodowanej jej nadmiernym wydzielaniem. Ponadto, o zwiększonej aktywności układu serotonergicznego świadczy zwiększony stosunek 5-HIAA/5-HT. Na uwagę zasługują również fakt, iż zmiany aktywności układu serotonergicznego mogą być kojarzone ze zmienionym działaniem osi HPA [POMPILI i współaut. 2010]. Z drugiej strony, synteza serotoniny może być hamowana przez glikokortykoidy uwalniane przez oś HPA [HASNI EBOU i współaut. 2016, SORGDRAGER i współaut. 2017]. Odnosząc się do literatury, wzrost stężenia tryptofanu oraz stosunku 5-HIAA/5-HT w odpowiedzi na podawanie inhibitorów COX może częściowo potwierdzać spadek aktywności osi HPA. Jednakże, sugerowany spadek aktywności osi HPA, wyrażony obniżeniem stężenia kortykosteronu w osoczu krwi, został zaobserwowany jedynie w przypadku blokowania COX-1.

4.6.5. „Aminokwasowa odpowiedź” istoty szarej okołowodociągowej na długotrwałe hamowanie aktywności cyklooksygenaz

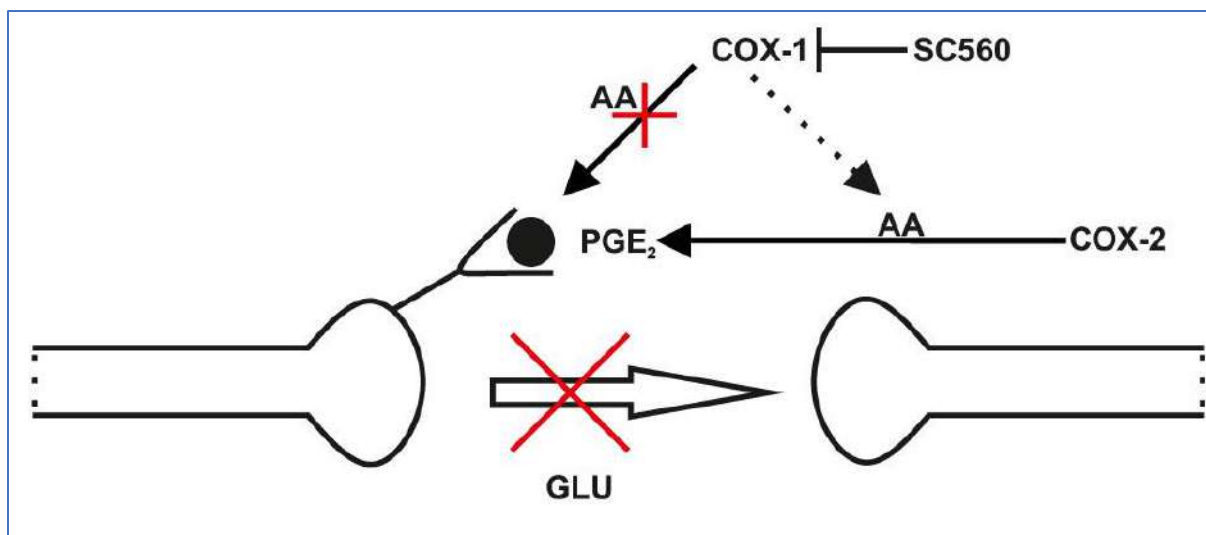
Istota szara okołowodociągowa jest strukturą śródmózgowia, znaną przede wszystkim z kluczowej roli w modulacji bólu. Jej aktywność może wyrażać się hamowaniem lub stymulacją przetwarzania informacji bólowych [MOKHTAR i SINGH 2020]. Ponadto, istota szara okołowodociągowa uczestniczy w regulowaniu zachowań obronnych i awersyjnych poprzez pobudzenie autonomiczne i emocjonalne [MOKHTAR i SINGH 2020].

Zawartość asparagianinu w istocie szarej okołowodociągowej uległa zmniejszeniu u zwierząt, którym podawano inhibitor COX-1 w warunkach septycznych. Jednakże, wspomniane zwierzęta w dalszym ciągu charakteryzowały się wyższym stężeniem badanego aminokwasu niż te, które otrzymywały inhibitor COX-1 w warunkach nieseptycznych.

Odnotowano, iż długotrwałe podawanie zwierzętom inhibitora COX-1 obniża stężenie glutaminianu w istocie szarej okołowodociągowej. Jednakże zwierzęta, u których

zaindukowano stan zapalny podczas hamowania COX-1, charakteryzowały się wyższym stężeniem glutaminianu niż te, które otrzymywały sam inhibitor. Ponadto, zwierzęta „zdrowe” otrzymujące celekoksyb wykazywały niższe stężenie glutaminianu niż osobniki przyjmujące SC560.

Istota szara okołowodociągowa jest bogata w glutaminian oraz specyficzne dla niego receptory. Aktywacja receptorów NMDA, szczególnie w bocznej oraz grzbietowo-bocznej części tego obszaru, może prowadzić do indukcji somatycznych zachowań obronnych np. bezruchu lub ucieczki [BITTENCOURT i współaut. 2004]. Badania LU i współaut. 2007 sugerują, iż aktywacja receptorów EP3 dla PGE2 w istocie szarej okołowodociągowej zwiększa odpowiedź nocyceptywną wywołaną przez modulowanie uwalniania glutaminianu. Przyłączenie cząsteczki PGE2 do receptora EP3 zlokalizowanego na zakończeniach presynaptycznych neuronów glutaminergicznych prowadzi do obniżenia uwalniania glutaminianu [LU i współaut. 2007]. W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano efekt odwrotny, polegający na spadku stężenia glutaminianu w odpowiedzi na długotrwałe hamowanie aktywności COX-1. W związku z tym, że glutaminian poprzez receptory NMDA w istocie szarej okołowodociągowej może indukować reakcje obronne, spadek jego zawartości sugeruje, że zwierzęta nie odczuwały potencjalnego zagrożenia. Ponadto, jak wspomniano wcześniej, asparaginian również wykazuje zdolność do aktywacji receptorów NMDA [DALANGIN i współaut. 2020]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że blokowanie aktywności COX-1 podczas stanu zapalnego powoduje spadek zawartości asparaginianu w tej strukturze OUN. Podsumowując wydaje się, że długotrwałe blokowanie aktywności COX-1 może osłabiać reakcje obronne oraz odpowiedź nocyceptywną poprzez obniżanie stężenia asparaginianu i glutaminianu w obrębie istoty szarej okołowodociągowej. Należy zauważyć, że podczas podawania zwierzętom SC560, COX-2 była wciąż aktywna. Oznacza to, że produkowana przez nią PGE2 mogła w dalszym ciągu aktywować receptory EP3 na zakończeniach presynaptycznych neuronów glutaminergicznych. Wyniki te mogą sugerować, że w efekcie obniżenia aktywności COX-1, doszło do wzrostu aktywności, drugiej izoformy COX, która doprowadziła do obniżenia stężenia asparaginianu i glutaminianu w istocie szarej okołowodociągowej.



Ryc. 2. Propozycja mechanizmu odpowiedzialnego za obniżenie wydzielania glutaminianu w obrębie istoty szarej okołowodociągowej. Lista skrótów: AA – kwas arachidonowy, COX-1,2 – cyklooksigenaza 1 lub 2, PGE₂ – prostaglandyna E₂, GLU – glutaminian.

Zaobserwowano, że długoterminowe hamowanie aktywności COX-2 u zwierząt „zdrowych” prowadzi do zwiększenia stężenia glicyny oraz GABA w istocie szarej okołowodociągowej. Ponadto, hamowanie aktywności COX-2 prowadziło do zwiększenia stężenia glicyny i GABA u zwierząt doświadczalnych, niż miało to miejsce podczas stosowania inhibitora COX-1. Ponadto zaobserwowano, że indukcja stanu zapalnego podczas długotrwałego przyjmowania przez zwierzęta celekoksybu, doprowadziła do obniżenia zawartości GABA w istocie szarej okołowodociągowej.

Neurony GABA-ergiczne występujące w istocie szarej okołowodociągowej to głównie interneurony, które mogą wpływać na aktywność struktury poprzez wewnętrzne obwody neuronalne. Wzrost stężenia GABA w analizowanej strukturze może być powiązany z reakcją organizmu na bodźce szkodliwe [REICHLING 1991]. Nawiązując do przedstawionych informacji, wzrost zawartości GABA będący skutkiem długotrwałego hamowania aktywności COX-2, można interpretować jako odpowiedź OUN na działanie czynnika szkodliwego. Ponadto, jak opisują CHOI i współaut. 2013, glicyna w obrębie istoty szarej okołowodociągowej może wzmacniać transmisję GABA-ergiczną, za pośrednictwem mechanizmu wykorzystującego glutaminian. Glicyna wykazuje powinowactwo nie tylko w stosunku do obecnych w tej strukturze receptorów glicynowych wrażliwych na strychninę lecz również do receptorów NMDA [CHOI i współaut. 2013]. Z tego powodu nie jest możliwe jednoznaczne określenie efektu jaki glicyna wywiera na istotę szarą okołowodociągową. Wydaje się, że wzrost stężenia GABA oraz glicyny jest prawdopodobnie związany z przetwarzaniem w OUN sygnału o działaniu czynnika szkodliwego, który potencjalnie może prowadzić do zaburzenia homeostazy narządów wewnętrznych. Na uwagę zasługuje również wynik porównania zawartości badanych aminokwasów między zwierzętami otrzymującymi inhibitor COX-1 oraz COX-2. Odnotowano, iż zwierzęta z zahamowaną aktywnością COX-2 wykazują wyższe stężenie glicyny oraz GABA w istocie szarej okołowodociągowej. Interpretując powyższy wynik rodzi się następujące pytanie,

czy silniejsze zmiany neurochemiczne istoty szarej okołowodociągowej są związane z faktem, iż w mózgu ssaków COX-2 stanowi izoformę dominującą? Czy jednak, tak silne zmiany neurochemiczne są wynikiem szczególnego zaburzenia homeostazy narządów wewnętrznych?

Podczas analizy zawartości tyrozyny w istocie szarej okołowodociągowej zaobserwowano istotny wpływ przeprowadzonych procedur eksperymentalnych na zawartość badanego aminokwasu. Długoterminowe hamowanie aktywności COX-1 w warunkach septycznych zwiększało jego stężenie. Z kolei blokowanie aktywności COX-2, niezależnie od stanu zapalnego, powodowało wzrost stężenia tyrozyny w badanej strukturze.

Uważamy, że wzrost zawartości tyrozyny w badanej strukturze, w odpowiedzi na podawane inhibitory COX, jest ściśle związany z ich wpływem na aktywność układu dopaminergicznego. Jak wcześniej wspomniano, do wzrostu stosunku DOPAC/DA dochodzi w wyniku wzmożonego wydzielania dopaminy, a następnie do jej wychwytu zwrotnego i przekształcenia przez MAO do DOPAC wewnątrz neuronu. Istota szara okołowodociągowa stanowi jedno z głównych źródeł dopaminy dla kluczowej struktury osi HPA jakim jest PVN. Wspomniana katecholamina jest syntetyzowana przez niejednorodną grupę neuronów dopaminergicznych, zlokalizowanych w grzbietowo-ogonowej części istoty szarej okołowodociągowej, a następnie jest wydzielana przez włókna dopaminergiczne w obrębie PVN [LI et al. 2014]. Sugerowany wzrost aktywności układu dopaminergicznego w obrębie istoty szarej okołowodociągowej może w specyficzny sposób wpływać na organizm ssaków. W związku z tym, że istota szara okołowodociągowa wydziela dopaminę w podwzgórzu, w tym w obrębie PVN, prowadzi to do istotnej aktywacji układu dopaminergicznego w centralnej składowej osi HPA. Następnie, w konsekwencji wzmożonej aktywności układu dopaminergicznego może dochodzić do spadku zawartości dopaminy, mobilizacji wewnątrzneuralnych rezerw tyrozyny oraz wspomnianego wcześniej możliwego wzrostu stężenia prolaktyny [FITZGERARD i DINAN 2008]. U ssaków działanie prolaktyny jest zazwyczaj kojarzone z umożliwianiem produkcji mleka oraz behawioralnym aspektem reprodukcji [SOBRINHO 1993]. Warto ponownie zaznaczyć, iż rola prolaktyny odnosi się również do modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz działania antystresowego [GUSTAFSON i współaut. 2017].

Uzyskane wyniki, świadczące o wzroście stężenia tyrozyny w istocie szarej okołowodociągowej w dużym stopniu potwierdzają aktywację układu dopaminergicznego w odpowiedzi na działanie inhibitorów COX w warunkach septycznych. Wydaje się, że organizm w sytuacji dużego zapotrzebowania na dopaminę dostarcza do OUN jej prekursor, a następnie dochodzi do jej magazynowania we właściwych dla niej miejscach syntezy. Podsumowując przedstawione informacje można przypuszczać, że inhibitory COX wywierają korzystny efekt w stosunku do trwającego na obwodzie organizmu stanu zapalnego. Wiadomym jest, iż na obwodzie organizmu ograniczają one nieprzyjemne odczucia towarzyszące stanowi zapalnemu, lecz warto również zwrócić uwagę na ich działanie ośrodkowe. Wydaje się, że wpływ NLPZ na istotę szarą okołowodociągową może prowadzić do zwiększenia stężenia prolaktyny w podwzgórzu, i w konsekwencji do obniżenia wydzielania hormonów stresu z jednoczesnym wzmocnieniem odpowiedzi immunologicznej.

Ponadto, mimo zaburzenia homeostazy narządów wewnętrznych, takie działanie inhibitorów COX może potencjalnie przeciwdziałać powstawaniu zachowań podobnych do depresji. Okazuje się, że do ich powstawania może dochodzić na skutek wysokiego stężenia kortykosteronu [JOHANSON i współaut. 2006].

Badanie zawartości tryptofanu w istocie szarej okołowodociągowej pozwoliło określić warunki, w których dochodziło do najistotniejszego obniżenia stężenia analizowanego aminokwasu. Zaobserwowano, iż zwierzęta, którym wielokrotnie podawano celekoksyb, w warunkach septycznych charakteryzowały się najniższą zawartością tryptofanu. Wszystkie wykonane porównania międzygrupowe, w których uczestniczyła wspomniana grupa zwierząt (CEL+LPS) potwierdzały powyższe informacje.

Serotonina w obrębie istoty szarej okołowodociągowej jest ściśle związana z odczuwaniem przez ssaki, w tym również ludzi, strachu. Podczas działania bodźców indukujących silną reakcję emocjonalną tj. strach, dochodzi do wzrostu aktywności układu serotonergicznego w grzbietowej i brzusznej części istoty szarej okołowodociągowej [GRAEFF 2003, WATSON i współaut. 2016]. Wiadomo, iż podczas stanu zapalnego powstaje szeroka gama związków prozapalnych, które po przeniknięciu do OUN zmieniają zachowanie zwierzęcia poprzez indukcję *sickness behaviour*. Zazwyczaj strach nie jest opisywany jako jedna ze składowych *sickness behaviour*, natomiast warto zwrócić uwagę na fakt, iż stan zapalny może prowadzić do zaburzenia nastroju lub nawet zaburzeń lękowych [FELGER 2018]. Wydaje się, że odczuwanie strachu stanowi sygnał poprzedzający wystąpienie reakcji behawioralnej np. zamierania zwierzęcia, mającej na celu przeciwdziałanie zagrożeniu [WATSON i współaut. 2016]. Powołując się na dane opublikowane przez innych autorów zakładamy, że natężenie strachu można wyrazić zwiększoną aktywnością układu serotonergicznego w obrębie analizowanej struktury. Na podstawie tych danych uważamy, że wykorzystanie wewnątrzneuronalnych rezerw tryptofanu, będące skutkiem wzmożonego wydzielania i syntezy serotoniny, może być związane ze stopniem w jakim doszło do indukcji *sickness behaviour* lub innego ochronnego mechanizmu behawioralnego.

5. Wnioski

Uzyskane dane upoważniają nas do sformułowania następujących wniosków:

– powodowany przez celekoksyb spadek aktywności układu noradrenergicznego, w analizowanych strukturach OUN, pień mózgu i przyśrodkowa kora przedczołowa, ogranicza, lecz nie blokuje przekazywania sygnału prozapalnego z obwodu organizmu do mózgu. Wskazuje to, iż aktywowana została neuronalna droga komunikacji odpornościowo-nerwowej, która w odpowiedzi na dootrzewnowe podanie LPS spowodowała wzrost uwalniania noradrenaliny w obrębie przyśrodkowej kory przedczołowej,

- efektem długotrwałego blokowania aktywności cyklooksygenaz jest wystąpienie ogólnego wzrostu aktywności układu dopaminergicznego w obrębie kresomózgowia, zarówno w hipokampie oraz przyśrodkowej korze przedczołowej, a także w podwzgórzu i w pniu mózgu,

- długotrwałe hamowanie aktywności obu izoform cyklooksygenaz u zwierząt „zdrowych”, powoduje wzrost aktywności transmisji serotoninerdycznej z jąder szwu do podwzgórza oraz przyśrodkowej kory przedczołowej,

- długotrwałe podawanie celekokoxybu stymuluje aktywność lokomotoryczną u zwierząt badanych. Blokowanie aktywności COX-2 spowodowało zwiększenie wartości wszystkich rejestrowanych parametrów, składających się na aktywność lokomotoryczną: przebyty dystans [cm], prędkość poruszania się [cm/s] oraz ogólny czas aktywności lokomotorycznej zwierząt [s],

- osobniki „zdrowe”, unikają zapachu zwierząt, u których doszło do potencjalnego zaburzenia homeostazy narządów wewnętrznych. Prawdopodobnie jest to efektem rozwiniętego narządu węchu u szczurów oraz obecności specyficznych białek w moczu osobników „chorych”, które poprzez ich obecność nieświadomie sygnalizują zagrożenie,

- długotrwałe podawanie zwierzętom celekokoxybu aktywuje ciała migdałowate lecz nie w ten sam sposób w jaki dochodzi do ich pobudzenia w odpowiedzi na stres ostrej. Wzrost stężenia asparagianu w obrębie tych struktur może być związany z oddziaływaniem na organizm stresu przewlekłego,

- blokowanie humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej, przez zahamowanie aktywności cyklooksygenaz, uruchamia potencjalne mechanizmy kompensujące to zaburzenie. Do wspomnianych mechanizmów zalicza się wzrost aktywności układu glicynerdycznego w strukturach pnia mózgu, które moduluja aktywność głównego reprezentanta neuronalnej drogi komunikacji odpornościowo-nerwowej - nerwu błędnego,

- zaburzenie homeostazy narządów wewnętrznych, spowodowane długotrwałym podawaniem inhibitorów cyklooksygenaz lub wywołanie eksperymentalnego stanu zapalnego prowadzi do rozwoju *sickness behaviour*. Objawia się to spadkiem zawartości glutaminianu w podwzgórzu, co z kolei może wpływać na obniżenie pobierania pokarmu ze środowiska,

- stosowanie inhibitorów cyklooksygenaz indukuje *sickness behaviour* przez obniżenie zawartości glicyny oraz GABA w podwzgórzu. Spadek zawartości GABA jest odpowiedzialny za obniżenie pobierania pokarmu przez zwierzęta. Natomiast spadek stężenia glicyny może powodować ograniczenie aktywności seksualnej zwierząt, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia rezerw energetycznych organizmu,
- blokowanie COX-1 lub COX-2 podczas stanu zapalnego wpływa odmiennie na kontrolę aktywności układu odpornościowego poprzez wydzielanie kortykosteronu. Na uwagę zasługuje fakt, iż zaobserwowane zjawisko zachodzi przy jednakowym oddziaływaniu obu inhibitorów na podwzgórzowy układ dopaminergiczny. Prawdopodobnie podczas hamowania aktywności COX-2 uruchomione zostały alternatywne mechanizmy umożliwiające aktywację osi HPA w odpowiedzi na obwodowy stan zapalny,
- hamowanie aktywności COX-1 prowadzi do obniżenia zawartości asparagianu oraz glutaminianu w istocie szarej okołowodociągowej, czego efektem może być osłabienie somatycznych reakcji obronnych oraz odpowiedzi nocycyptywnej organizmu.

6. Streszczenie

Obecnie, wśród społeczeństw krajów rozwiniętych oraz rozwijających się można zaobserwować tendencję do coraz częstszego stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Jest to związane przede wszystkim z: powszechnym dostępem do tego typu specyfików, brakiem wymogu recepty oraz występowaniem chorób związanych z przewlekłym stanem zapalnym, np. reumatoidalne zapalenie stawów. Wiadomo, że NLPZ poprzez hamowanie aktywności cyklooksygenazy 1 lub 2 (COX-1 lub COX-2), ograniczają syntezę prostaglandyny E₂ (PGE₂) i tym samym niwelują nieprzyjemne doznania towarzyszące stanowi zapalnemu. Cyklooksygenazy oraz PGE₂ są niezwykle istotnymi elementami współtworzącymi humoralną drogę komunikacji nerwowo-odpornościowej. W związku z tym, w wyniku długotrwałego działania NLPZ może dojść do zaburzenia komunikacji między układem odpornościowym a ośrodkowym układem nerwowym (OUN). Warto nadmienić, iż podczas długotrwałego blokowania aktywności cyklooksygenaz, neuronalna droga komunikacji nerwowo-odpornościowej, której głównym reprezentantem jest nerw błędny, pozostaje w pełni sprawna.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na określenie długotrwałego wpływu NLPZ na aktywność wybranych struktur OUN. Uzyskane dane umożliwiły zweryfikowanie hipotezy zakładającej występowanie potencjalnych mechanizmów kompensujących zaburzenie humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej. Sprawdzone również czy długoterminowe blokowanie aktywności cyklooksygenaz wpływa na zachowanie zwierząt eksperymentalnych. Ponadto, zbadano wpływ długoterminowego hamowania aktywności cyklooksygenaz na stężenie cytokin prozapalnych oraz kortykosteronu w osoczu krwi badanych zwierząt.

Materiał biologiczny niezbędny do przeprowadzenia doświadczeń stanowiło osocze krwi oraz mózgowia szczurów stada niekrewniaczego Wistar. Z mózgowia wyizolowano następujące struktury: pień mózgu, podwzgórze, kora ciemieniowa, hipokamp, przyśrodkowa kora przedczołowa, ciało migdałowe oraz istota szara okołowodociągowa. Techniki oraz metody wykorzystane w celu przeprowadzenia analiz biochemicznych stanowiły: wysokosprawną chromatografię cieczową, metodę radioimmunologiczną oraz metodę immunoenzymatyczną. Określenia wpływu NLPZ na zachowanie zwierząt dokonano przy użyciu testu uniesionego labiryntu krzyżowego.

Uzyskane wyniki pokazują istotny wpływ długotrwałego hamowania aktywności cyklooksygenaz na aktywność monoaminergicznych układów neurotransmisyjnych tj. noradrenergicznego, dopaminergicznego oraz serotonergicznego. Wykazano, że długotrwałe podawanie zwierzętom inhibitorów, odpowiednio COX-1 i COX-2 doprowadziło do powstania istotnych zmian w zawartości aminokwasów neurotransmisyjnych: asparagianu, glutaminianu, glicyny, kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), oraz aminokwasów będących prekursorami katecholamin i serotoniny, tj. tyrozyny oraz tryptofanu. Zaobserwowano również, że blokowanie aktywności COX-2 lecz nie COX-1 spowodowało wzrost wszystkich zmiennych składających się na aktywność lokomotoryczną

badanych zwierząt: przebyty dystans, prędkość poruszania się oraz ogólny czas aktywności lokomotorycznej. Podsumowując, uzyskane w doświadczeniu wyniki biochemiczne oraz behawioralne sugerują, że w odpowiedzi na zaburzenie aktywności jednej z dróg komunikacji nerwowo-odpornościowej dochodzi do uruchomienia potencjalnych mechanizmów kompensujących to zaburzenie. Świadczy o tym choćby wzrost aktywności układu glicynergicznego, indukowany przez blokowanie COX-1 lub COX-2, w strukturach pnia mózgu, modulujących aktywność głównego reprezentanta drogi neuronalnej, tj. nerwu błędnego. Ponadto, zaobserwowano, iż blokowanie aktywności COX-1 lub COX-2 wpływa odmiennie na wydzielanie kortykosteronu, w odpowiedzi na iniekcję lipopolisacharydu, przy jednakowym oddziaływaniu na podwzgórzowy układ dopaminergiczny. Wydaje się, że podczas hamowania aktywności COX-2 uruchamiane są mechanizmy kompensujące, umożliwiające aktywację osi HPA w odpowiedzi na trwający na obwodzie organizmu stan zapalny.

Zgromadzone dane eksperymentalne potwierdzają hipotezę zakładającą, że organizm za pośrednictwem szczególnych mechanizmów kompensuje zaburzenia w sygnalizacji między układem odpornościowym i OUN. Uzyskane wyniki pokazują kierunek dalszych badań, które doprowadzą do precyzyjnego poznania mechanizmów plastyczności organizmu.

6.1. Abstract

Currently, among the developed societies and developing countries, there is a tendency to more frequently use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). It is primarily related to universal access to drugs of this type, the lack of a prescription requirement, and the occurrence of associated diseases with chronic inflammation (e.g. rheumatoid arthritis). As it is known, NSAIDs, by inhibiting the activity of cyclooxygenases, 1 or 2 (COX-1 or COX-2), limits the synthesis of prostaglandin E2 (PGE2) and thus eliminates the unpleasant sensations associated with inflammation. As it is known, cyclooxygenases and PGE2 are relevant elements co-creating the humoral pathway of neuro-immune communication. Therefore, as a result of the long-lasting effect of NSAIDs, communication between the immune system and the central nervous system (CNS) may be impaired. It is worth mentioning that during long-term blocking of the activity of cyclooxygenases, the neuronal pathway of neuroimmune communication, the main representative of which is the vagus nerve, remains intact.

Through the conducted experiments, the influence of the long-lasting effect of NSAIDs on the activity of selected CNS structures was determined. The obtained results allowed to verify the hypothesis assuming the presence of potential compensating mechanisms for the disturbance of the humoral pathway of neuro-immune communication. It was also checked whether long-term blocking of cyclooxygenase activity affects the behaviour of experimental animals. In addition, the effect of long-term inhibition of cyclooxygenases activity on the concentration of pro-inflammatory cytokines and corticosterone in the plasma of experimental animals was examined.

The biological material necessary to perform the experiments was the plasma and brains of outbred Wistar rats. From their brains, the specific structures were isolated, which were: the brainstem, hypothalamus, cerebral cortex, hippocampus, medial prefrontal cortex, amygdala, and periaqueductal gray matter. Techniques and methods used to carry out biochemical analyzes were high-performance liquid chromatography, radioimmunoassay, and enzyme immunoassay. The determination of the effect of NSAIDs on animal behaviour was performed using the elevated plus maze test.

The obtained results show a significant effect of long-lasting inhibition of cyclooxygenases activity on the activity of monoaminergic neurotransmission systems i.e. noradrenergic, dopaminergic, and serotonergic. Moreover, chronic administration of a COX-1 and COX-2 inhibitors to animals led to significant changes in the content of neurotransmission amino acids: aspartate, glutamate, glycine, gamma-aminobutyric acid (GABA), and also precursors of catecholamines and serotonin e.g. tyrosine, and tryptophan. It was also observed that blocking the activity of COX-2 but not COX-1 increased all variables that make up the locomotor activity of the tested animals: distance traveled, speed of movement, and overall activity time. To sum up, the biochemical and behavioural results obtained in the experiment suggest that in response to a disturbance in the activity of one of the neuro-immune communication pathways, potential compensatory mechanisms are triggered. An excellent example is an increase in the activity of the glycinergic system, induced by blocking COX-1 or COX-2, in structures located in the brainstem, modulating the activity of the main representative of the neuronal pathway - the vagus nerve. In addition, it has been observed that blocking COX-1 or COX-2 activity affects corticosterone secretion differently in response to the injection of lipopolysaccharide, with the same effect on the hypothalamic dopaminergic system. When COX-2 is inhibited, compensatory mechanisms appear to trigger activation of the HPA axis in response to ongoing peripheral inflammation.

The collected results support the hypothesis that the body compensates for disorders in signaling between the immune system and the CNS through specific mechanisms. I also believe that the obtained results show the direction of further research, which would enable a more detailed understanding of the mechanisms of CNS plasticity or even the whole organism.

7. Piśmiennictwo

- Andolina D, Borreca A. *The key role of the amygdala in stress*. In: *The Amygdala: Where Emotions Shape Perception, Learning and Memories*. Fondazione Santa Lucia, Rome, Italy, 2017. 187-213. dx.doi.org/10.5772/67826
- Aristizábal B, González Á. Innate immune system. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editors. *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. Chapter 2.
- Arnsten AF. 2009. Stress signaling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature reviews neuroscience*. 10(6), 410-422. <https://doi.org/10.1038/nrn2648>
- Akil M, Kolachana BS, Rothmond DA, Hyde TM, Weinberger DR, Kleinman JE. 2003. Catechol-O-methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain. *Journal of Neuroscience*. 23(6), 2008-2013. 10.1523/JNEUROSCI.23-06-02008.2003
- Arnsten AF, Raskind MA, Taylor FB., Connor DF. 2015. The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. *Neurobiology of stress*. 1, 89-99. 10.1016/j.ynstr.2014.10.002
- Bear MH, Reddy V, Bollu PC. *Neuroanatomy, Hypothalamus*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), 2021. 1-11. PMID: 30252249
- Billman GE. 2020. Homeostasis: the underappreciated and far too often ignored central organizing principle of physiology. *Frontiers in physiology*. 11, 1-30. 10.3389/fphys.2020.00200
- Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. 2020. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*. 180, 1-181. 10.1016/j.bcp.2020.114147
- Bittencourt AS, Carobrez ADP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC. 2004. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*. 125(1), 71-89. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.026
- Botting R, Ayoub SS. 2005. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*. doi: 10.1016/j.plefa.2004.10.005. PMID: 15626590.
- Breit S, Kupferberg A, Rogler G, Hasler G. 2018. Vagus nerve as modulator of the brain–gut axis in psychiatric and inflammatory disorders. *Frontiers in psychiatry*. 44, 1-58. 10.3389/fpsyt.2018.00044
- Briend F, Nelson EA, Maximo O, Armstrong WP, Kraguljac NV, Lahti AC. 2020. Hippocampal glutamate and hippocampus subfield volumes in antipsychotic-naïve first episode psychosis subjects and relationships to duration of untreated psychosis. *Translational psychiatry*. 10(1), 1-11. doi.org/10.1038/s41398-020-0812-z
- Carthy E, Ellender T. 2021. Histamine, neuroinflammation and neurodevelopment: A review. *Frontiers in neuroscience*. 15, 1-26. 10.3389/fnins.2021.680214
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(21), 13926-13931. doi.org/10.1073/pnas.162468699
- Charnay Y, Leger L. 2010. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues in clinical neuroscience*. 12(4), 471-87. 10.31887/DCNS.2010.12.4/ycharnay

- Choi KH, Nakamura M, Jang IS. 2013. Presynaptic glycine receptors increase GABAergic neurotransmission in rat periaqueductal gray neurons. *Neural plasticity*. 1-9. 10.1155/2013/954302
- Crespi F. 2017. Serotonin (5-HT) release in the hippocampus following various conditions and treatments affecting 5-HT receptors has been studied in vivo mainly by the means of brain micro-dialysis: A review. *Biology, Engineering and Medicine*. 2(4), 1-4. 10.15761/BEM.1000128
- Cryer B, Barnett MA, Wagner J, Wilcox CM. 2016. Overuse and misperceptions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the United States. *The American journal of the medical sciences*. 352(5), 472-480. 10.1016/j.amjms.2016.08.028
- Dale E, Pehrson AL, Jeyarajah T, Li Y, Leiser SC, Smagin G, Olsen ChK, Sanchez C. 2016. Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS spectrums*. 21(2), 143-161. 10.1017/S1092852915000425.
- Dantzer R. 2018. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa. *Physiological reviews*. 98(1), 477-504. 10.1152/physrev.00039.2016
- Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM., Kelley KW. 2000. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Autonomic Neuroscience*. 85(1-3), 60-65. 10.1016/S1566-0702(00)00220-4
- De Bartolomeis A, Manchia M, Marmo F, Vellucci L, Iasevoli F, Barone A. 2020. Glycine signaling in the framework of dopamine-glutamate interaction and postsynaptic density. Implications for treatment-resistant schizophrenia. *Frontiers in psychiatry*. 11, 1-20. 369. 10.3389/fpsyt.2020.00369
- Delgado T. C. 2013. Glutamate and GABA in Appetite Regulation. *Frontiers in endocrinology*. 103, 1-28. doi.org/10.3389/fendo.2013.00103
- Elander L, Engström L, Ruud J, Mackerlova L, Jakobsson PJ, Engblom D, Nilsberth C, Blomqvist A. 2009. Inducible prostaglandin E2 synthesis interacts in a temporally supplementary sequence with constitutive prostaglandin-synthesizing enzymes in creating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to immune challenge. *Journal of Neuroscience*. 29(5), 1404-1413.
- Engeland, C. G., Nielsen, D. V., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. P. (2001). Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. *Physiology & behavior*, 72(4), 481-491. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00436-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00436-4)
- Eskilsson A, Matsuwaki T, Shionoya K, Mirrasekhian E, Zajdel J, Schwaninger M, Engblom D, Blomqvist A. 2017. Immune-induced fever is dependent on local but not generalized prostaglandin E2 synthesis in the brain. *Journal of Neuroscience*. 37(19), 5035-5044. 10.1523/jneurosci.3846-16.2017
- Ezure K., Tanaka I, Kondo M. 2003. Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *Journal of Neuroscience*. 23(26), 8941-8948. 10.1523/jneurosci.23-26-08941.2003
- Fowler CJ. 2007. The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. *British journal of pharmacology*. 152(5), 594-601. 10.1038/sj.bjp.0707483
- Felger JC. 2018. Imaging the role of inflammation in mood and anxiety-related disorders. *Current Neuropsychopharmacology*. 16(5), 533-558. 10.2174/1570159X15666171123201142
- Feltes PK, Doorduyn J, Klein HC., Juárez-Orozco LE, Dierckx RA, Moriguchi-Jeckel CM, De Vries EF. 2017. Anti-inflammatory treatment for major depressive disorder:

- implications for patients with an elevated immune profile and non-responders to standard antidepressant therapy. *Journal of Psychopharmacology*. 31(9), 1149-1165. 10.1177/0269881117711708
- Gallowitsch-Puerta M, Pavlov VA. 2007. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sciences*. 80(24-25), 2325-2329. 10.1016/j.lfs.2007.01.002
- Garrett MC, Soares-da-Silva P. 1990. Role of type A and B monoamine oxidase on the formation of 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in tissues from the brain of the rat. *Neuropharmacology*. 29(10), 875-879. 10.1023/a:1020799700885
- Ghlichloo I, Gerriets V. 2022. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL). 1-10. PMID: 31613522
- Gislason GH, Jacobsen S, Rasmussen JN, Rasmussen S, Buch P, Friberg J, Schramm TK, Abildstrom Z, Køber L, Madsen M, Torp-Pedersen C. 2006. Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction. *Circulation*. 113(25), 2906-2913. 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.616219
- Glaser ST, Kaczocha M. 2010. Cyclooxygenase-2 mediates anandamide metabolism in the mouse brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 335(2), 380-388. 10.1124/jpet.110.168831
- Graeff FG. 2003. Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder. *Brazilian Journal of Psychiatry*. 25, 42-45. 10.1590/s1516-44462003000600010
- Graves SM, Xie Z, Stout KA, Zampese E, Burbulla LF, Shih JC, Kondapalli J, Patriarchi T, Tian L, Brichta L, Greengard P, Krainc D, Schumacker PT, Surmeier DJ. 2020. Dopamine metabolism by a monoamine oxidase mitochondrial shuttle activates the electron transport chain. *Nature neuroscience*. 23(1), 15-20. 10.1038/s41593-019-0556-3
- Gustafson P, Kokay I, Sapsford T, Bunn S, Grattan D. 2017. Prolactin regulation of the HPA axis is not mediated by a direct action upon CRH neurons: evidence from the rat and mouse. *Brain Structure and Function*. 222(7), 3191-3204. 10.1007/s00429-017-1395-1
- Guyenet SJ, Matsen ME, Morton GJ, Kaiyala KJ, Schwartz MW. 2013. Rapid glutamate release in the mediobasal hypothalamus accompanies feeding and is exaggerated by an obesogenic food. *Molecular metabolism*. 2(2), 116-122. doi.org/10.1016/j.molmet.2013.02.001
- Hangai S, Ao T, Kimura Y, Matsuki K, Kawamura T, Negishi H, Nishio J, Kodama T, Taniguchi T, Yanai H. 2016. PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113(14), 3844-3849. 10.1073/pnas.1602023113
- Hasni Ebou M, Singh-Estivalet A, Launay JM, Callebort J, Tronche F, Ferré P, Gautier JF, Guillemain G, Bréant B, Blondeau B, Riveline JP. 2016. Glucocorticoids Inhibit Basal and Hormone-Induced Serotonin Synthesis in Pancreatic Beta Cells. *PloS one*. 11(2), e0149343. doi.org/10.1371/journal.pone.0155174
- Hastings TG. 1995. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *Journal of neurochemistry*. 64(2), 919-924. 10.1046/j.1471-4159.1995.64020919.x
- Higgins AJ, Lees P. 1984. The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Equine Veterinary Journal*. 16(3), 163-175. 10.1111/j.2042-3306.1984.tb01893.x

- Höglund E, Øverli Ø, Winberg S. 2019. Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: a comparative review. *Frontiers in endocrinology*. 158, 1-28. 10.3389/fendo.2019.00158
- Hornung JP. 2010. The neuroanatomy of the serotonergic system. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Elsevier. 21, 51-64. doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70071-0
- Jankord R, Herman JP. 2008. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1148, 64–73. 10.1196/annals.1410.012
- Johansson D, Falk A., Marcus MM, Svensson TH. 2012. Celecoxib enhances the effect of reboxetine and fluoxetine on cortical noradrenaline and serotonin output in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 39(1), 143-148. 10.1016/j.pnpbp.2012.06.003
- Kavaliers M, Ossenkopp KP, Choleris E. 2019. Social neuroscience of disgust. *Genes, Brain and Behavior*. 18(1), 1-13. 10.1111/gbb.12508
- Kavaliers M, Ossenkopp KP, Choleris E. 2020. Pathogens, odors, and disgust in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 119, 281-293. 10.1016/j.neubiorev.2020.09.037
- Kenny BJ, Bordoni B. 2021. Neuroanatomy, Cranial Nerve 10 (Vagus Nerve). In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL). 1-10. PMID: 30725856
- Kim JJ, Diamond, D. M. 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*. 3(6), 453-462. 10.1038/nrn849
- Li J, Chen L, Guo F, Han X. 2020. The effects of GABAergic system under cerebral ischemia: Spotlight on cognitive function. *Neural Plasticity*. 2020, 1-9 <http://doi.org/10.1155/2020/8856722>
- Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish AD. 2017. Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature neuroscience*. 20(11), 1434-1447. 10.1038/nn.4661
- Lopes PC, Block P, König B. 2016. Infection-induced behavioural changes reduce connectivity and the potential for disease spread in wild mice contact networks. *Scientific reports*. 6(1), 1-10. doi.org/10.1038/srep31790
- Lu J, Xing J, Li J. 2007. Prostaglandin E2 (PGE2) inhibits glutamatergic synaptic transmission in dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG). *Brain research*. 1162, 38-47. 10.1016/j.brainres.2007.06.004
- Lv L, Bai D, Ma Y, Liu K, Ma Y. 2021. The PGE2 receptor EP3 plays a positive role in the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activity in the hypothalamus under immobilization stress. *Brain Research Bulletin*. 168, 45-51. 10.1016/j.brainresbull.2020.12.014
- Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, Gałecki P, Leonard B. 2012. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC medicine*. 10(1), 1-19. 10.1186/1741-7015-10-66
- Mei YW, Yang ZQ, Wang W, Song DG, Deng XM, Liu JX. 2008. Acute electrical stimulation of nucleus ambiguus enhances immune function in rats. *Canadian journal of neurological sciences*. 35(4), 441-447. 10.1017/s0317167100009094
- Mello BSF, Chaves Filho AJM, Custódio CS, Cordeiro RC, Miyajima F, De Sousa FCF, Vasconcelos MMS, De Lucena DF, Macedo D. 2018. Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. *Journal of neuroimmunology*. 320, 133-142. 10.1016/j.jneuroim.2018.04.009

- Mello-Carpes PB, Izquierdo I. 2013. The nucleus of the solitary tract→ nucleus paragigantocellularis→ locus coeruleus→ CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*. 100, 56-63. doi.org/10.1016/j.nlm.2012.12.002
- Minghetti L, Greco A, Cardone F, Puopolo M, Ladogana A, Almonti S, Cunningham C, Perry HV, Pocchiari M, Levi, G. (2000). Increased brain synthesis of prostaglandin E2 and F2-isoprostane in human and experimental transmissible spongiform encephalopathies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 59(10), 866-871. 10.1093/jnen/59.10.866
- Minghetti L. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 63(9), 901-910. 10.1093/jnen/63.9.901
- Mokhtar M, Singh, P. 2020. Neuroanatomy, Periaqueductal Gray. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)*. 1-7. PMID: 31990494
- Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. 2018. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 14(2), 1-10. doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1
- Nijijima A. 1995. An electrophysiological study on the vagal innervation of the thymus in the rat. *Brain research bulletin*. 38(4), 319-323. 10.1016/0361-9230(95)00103-1
- Otto GM, Franklin CL, Clifford CB. 2015. Biology and diseases of rats. *Laboratory animal medicine*. 2015, 151-207. doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00004-3
- Oz M, Jaligam V, Galadari S, Petroianu G, Shuba YM, Shippenberg TS. 2010. The endogenous cannabinoid, anandamide, inhibits dopamine transporter function by a receptor-independent mechanism. *Journal of neurochemistry*. 112(6), 1454-1464. 10.1111/j.1471-4159.2009.06557.x
- Rall JM, Mach SA, Dash PK. 2003. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain research*, 968(2), 273-276. 10.1016/s0006-8993(03)02248-0
- Parada MA, Hernandez L, De Parada MP, Paez X, Hoebel BG. 1990. Dopamine in the lateral hypothalamus may be involved in the inhibition of locomotion related to food and water seeking. *Brain research bulletin*. 25(6), 961-968. doi.org/10.1016/0361-9230(90)90195-6
- Pare D, Duvarci S. 2012. Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction. *Current opinion in neurobiology*. 22(4), 717-723. 10.1016/j.conb.2012.02.014
- Parsons CG., Danysz W, Hesselink M, Hartmann S, Lorenz B, Wollenburg C, Quack G. 1998. Modulation of NMDA receptors by glycine—introduction to some basic aspects and recent developments. *Amino acids*. 14(1), 207-216. http://doi.org/10.1007/BF01345264
- Pavlov VA, Tracey KJ. 2012. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol*. 8, 743-754. 10.1038/nrendo.2012.189
- Pavlov VA., Chavan SS., Tracey KJ. 2018. Molecular and functional neuroscience in immunity. *Annual review of immunology*. 36, 783-812. 10.1146/annurev-immunol-042617-053158
- Pecchi E, Dallaporta M, Jean A., Thirion S., Troadec JD. 2009. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiology & behavior*. 97(3-4), 279-292. doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.040
- Pessoa L. 2011. Reprint of: Emotion and cognition and the amygdala: From “what is it?” to “what's to be done?”. *Neuropsychologia*. 49(4), 681-694. doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2011.02.030

- Pompili M., Serafini G, Innamorati M, Möller-Leimkühler AM, Giupponi G, Girardi P, Tatarelli R, Lester D. 2010. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and serotonin abnormalities: a selective overview for the implications of suicide prevention. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 260(8), 583-600. doi.org/10.1007/s00406-010-0108-z
- Pontes A, Zhang Y, Hu W. 2013. Novel functions of GABA signaling in adult neurogenesis. *Frontiers in biology*. 8(5), 1-34. doi.org/10.1007/s11515-013-1270-2
- Posner MI, Rothbart MK, Rueda MR. 2013. Developing attention and self-regulation in infancy and childhood. In: *Neural Circuit and Cognitive Development*. Academic Press. 22, 395-411. doi.org/10.1016/B978-0-12-397267-5.00059-5
- Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M. 1996. Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience*. 75(3), 737-755. 10.1016/0306-4522(96)00278-3
- Rangel A, Camerer C, Montague PR. 2008. Neuroeconomics: The neurobiology of value-based decision-making. *Nature Reviews. Neuroscience*. 9(7), 545. doi:10.1038/nrn2357.
- Reardon C, Murray K., Lomax AE. 2018. Neuroimmune communication in health and disease. *Physiological reviews*. 98(4), 2287-2316. 10.1152/physrev.00035.2017
- Reguła J, Wocial T, Kraszewska E, Butruk E. 2011. Stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w Polsce—badanie ankietowe u 38 tysięcy chorych. *Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy*. 3(2), 72-78.
- Reichling DB. 1991. GABAergic neuronal circuitry in the periaqueductal gray matter. In: *Depaulis. The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. Springer, Boston, MA. 213, 329-344. doi.org/10.1007/978-1-4615-3302-3_18
- Ryczko D, Dubuc R. 2017. Dopamine and the brainstem locomotor networks: from lamprey to human. *Frontiers in neuroscience*. 11(295), 1-10. 10.3389/fnins.2017.00295
- Ryczko D, Grätsch S, Auclair F, Dubé C, Bergeron S, Alpert MH, Cone JJ, Roitman MF, Alford S, Dubuc R. 2013. Forebrain dopamine neurons project down to a brainstem region controlling locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(34), 3235-3242. doi.org/10.1073/pnas.1301125110
- Saper CB, Romanovsky AA, Scammell TE. 2012. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nature neuroscience*. 15(8), 1088–1095. https://doi.org/10.1038/nn.3159
- Shahid Z, Asuka E, Singh G. 2022. Physiology, Hypothalamus. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)*. 1-11. PMID: 30571001.
- Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Dimitriadis F, Shimizu S, Yokotani K, Saito M. 2014. Possible involvement of brain prostaglandin E2 and prostanoid EP3 receptors in prostaglandin E2 glycerol ester-induced activation of central sympathetic outflow in the rat. *Neuropharmacology*. 82, 19-27. 10.1016/j.neuropharm.2014.03.005
- Shires GT. 1989. Important factors in the maintenance of homeostasis in the surgical patient. *Acta Chirurgica Scandinavica. Supplementum*. 550, 29-33. PMID: 2496546
- Sibbald B. 2004. Rofecoxib (Vioxx) voluntarily withdrawn from market. *Canadian Medical Association Journal*. 171(9), 1027-1028. 10.1503/cmaj.1041606
- Šimić G, Tkalčić M, Vukić V, Mulc D, Španić E, Šagud M, Olucha-Bordonau FE, Vukšić M, Hof RP. 2021. Understanding emotions: Origins and roles of the amygdala. *Biomolecules*. 11(6), 1-119. 10.3390/biom11060823
- Skórzewska A, Lehner M, Wisłowska-Stanek A, Turzyńska D, Sobolewska A, Krząścik P, Płaźnik A. 2015. GABAergic control of the activity of the central nucleus of the

- amygdala in low-and high-anxiety rats. *Neuropharmacology*. 99, 566-576. 10.1016/j.neuropharm.2015.08.039
- Sobrinho LG. 1993. The psychogenic effects of prolactin. *Acta Endocrinologica*. 129, 38-40. PMID: 8372607
- Song C, Zhang WH, Wang XH, Zhang JY, Tian XL, Yin XP, Pan BX. 2017. Acute stress enhances the glutamatergic transmission onto basoamygdala neurons embedded in distinct microcircuits. *Molecular brain*. 10(1), 1-10. doi.org/10.1186/s13041-016-0283-6
- Sorgdrager FJH, Doornbos B, Penninx BWJH, de Jonge P, Kema IP. 2017. The association between the hypothalamic pituitary adrenal axis and tryptophan metabolism in persons with recurrent major depressive disorder and healthy controls. *Journal of affective disorders*. 222, 32-39. doi.org/10.1016/j.jad.2017.06.052
- Strehl C, Ehlers L, Gaber T, Buttgereit F. 2019. Glucocorticoids—All-Rounders tackling the versatile players of the immune system. *Frontiers in immunology*. 10, 1744. 10.3389/fimmu.2019.01744
- Suleyman H, Demircan B, Karagoz Y. 2007. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological reports*. 59(3), 247-58. PMID: 17652824.
- Suyama S, Yada T. 2018. New insight into GABAergic neurons in the hypothalamic feeding regulation. *The Journal of Physiological Sciences*. 68(6), 717-722. 10.1007/s12576-018-0622-8
- Taylor BK, Westlund KN. 2017. The noradrenergic locus coeruleus as a chronic pain generator. *Journal of neuroscience research*. 95(6), 1336-1346. 10.1002/jnr.23956
- Teather LA, Packard MG, Bazan NG. 2002. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learning & Memory*. 9(1), 41-47. 10.1101/lm.43602
- Umek, N., Geršak, B., Vintar, N., Šoštarič, M., & Mavri, J. (2018). Dopamine autoxidation is controlled by acidic pH. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 467. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00467>
- Watson TC, Cerminara NL, Lumb BM, Apps R. 2016. Neural correlates of fear in the periaqueductal gray. *Journal of Neuroscience*. 36(50), 12707-12719. 10.1523/jneurosci.1100-16.2016
- Wheeler MD, Ikejema K, Enomoto N, Stacklewitz RF, Seabra V, Zhong Z, Yin M, Schemmer P, Rose ML, Rusyn I, Bradford B, Thurman RG. 1999. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 56(9), 843-856. 10.1007/s000180050030
- Wrotek S, LeGrand EK, Dzialuk A, Alcock J. 2021. Let fever do its job: The meaning of fever in the pandemic era. *Evolution, Medicine, and Public Health*. 9(1), 26-35. 10.1093/emph/eoaa044
- Wu C, Qin X, Du H, Li N, Ren W, Peng Y. 2017. The immunological function of GABAergic system. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 22(7), 1162-1172. 10.2741/4539
- Xiao JY, Xiong BR, Zhang W, Zhou WC, Yang H, Gao F, Xiang HB, Manyande A, Tian XB, Tian YK. 2018. PGE2-EP3 signaling exacerbates hippocampus-dependent cognitive impairment after laparotomy by reducing expression levels of hippocampal synaptic plasticity-related proteins in aged mice. *CNS neuroscience & therapeutics*. 24(10), 917–929. doi.org/10.1111/cns.12832
- Yagami T, Koma H, Yamamoto Y. 2016. Pathophysiological roles of cyclooxygenases and prostaglandins in the central nervous system. *Molecular neurobiology*. 53(7), 4754-4771. 10.1007/s12035-015-9355-3

- Young IR, Loose JM, Kleftogiannis F, Canny BJ. 1996. Prostaglandin E2 acts via the hypothalamus to stimulate ACTH secretion in the fetal sheep. *Journal of neuroendocrinology*. 8(9), 713-720. 10.1111/j.1365-2826.1996.tb00708.x
- Zarghi A, Arfaei S. 2011. Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 10(4), 1-42. PMID: PMC3813081
- Zhang X, Ge TT, Yin G, Cui R, Zhao G, Yang W. 2018. Stress-induced functional alterations in amygdala: implications for neuropsychiatric diseases. *Frontiers in neuroscience*. 12, 1-30. 10.3389/fnins.2018.00367
- Zhu Y, Gao H, Tong L, Li Z, Wang L, Zhang C, Yang Q, Yan B. 2019. Emotion regulation of hippocampus using real-time fMRI neurofeedback in healthy human. *Frontiers in human neuroscience*. 13, 1-32. 10.3389/fnhum.2019.00242
- Zhuravleva ZD, Lebedeva AV, Volnova AB, Mukhina IV, Druzin MY. 2015. The effect of glycine microinjections in the medial preoptic area of the hypothalamus on the sexual behavior of male rats. *Neurochemical Journal*. 9(2), 141-145. doi.org/10.1134/S1819712415020117
- Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D. 2009. Cyclooxygenase in normal human tissues—is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *Journal of cellular and molecular medicine*. 13, 1-22. 10.1111/j.1582-4934.2008.00430.x

8. Wykaz publikacji i manuskryptów

PAWEŁ NAPORA, ANNA KOBRZYCKA, MAREK WIECZOREK

*Katedra Neurobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
E-mail: pawel.napora@unilodz.eu
marek.wieczorek@biol.uni.lodz.pl*

PROSTAGLANDYNA E2 JAKO CZĄSTECZKA KOMUNIKACJI POMIĘDZY UKŁADEM NERWOWYM I ODPORNOŚCIOWYM

HUMORALNA DROGA KOMUNIKACJI UKŁADU NERWOWEGO Z ODPORNOŚCIOWYM

Inwazja patogenów prowadzi do zaburzenia zarówno lokalnej, jak i ogólnej homeostazy organizmu. Stan taki skutkuje aktywacją układu odpornościowego i uruchomieniem kaskady reakcji określanych mianem odpowiedzi zapalnej. Odpowiedź ta ma na celu ograniczenie rozwoju patogenu, jego unieszkodliwienie i usunięcie z organizmu. Procesy prozapalne obejmują między innymi syntezę szeregu substancji sygnałowych, które docierając do OUN pozwalają na uruchomienie centralnie kontrolowanych procesów przeciwzapalnych, zapobiegających nadmiernej aktywacji układu odpornościowego, prowadzącej potencjalnie do alergii lub chorób autoimmunologicznych (UFNAL i WOŁYŃCZYK-GMAJ 2011).

Kluczową rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami pro- i przeciwzapalnymi pełni efektywna wymiana informacji pomiędzy układem odpornościowym i nerwowym. W toku ewolucji organizmy zwierząt wykształciły specyficzne mechanizmy, za pośrednictwem których OUN jest informowany o stanie wzbudzenia układu odpornościowego (SKOWRON-CENDRZAK 1993). Literatura naukowa klasyfikuje je jako mechanizmy komórkowe i humoralne (REARDON i współaut. 2018). Tak zgrupowane mechanizmy współtworzą dwie odmienne drogi komunikacji między omawianymi układami: nerwową i

humoralną. Droga nerwowa, funkcjonująca za pośrednictwem nerwów obwodowych, reprezentowana jest m.in. przez wstępujące włókna czuciowe nerwu błędnego (KOBRYCKA i współaut. 2017). Drogę humoralną stanowią mediatory uwalniane do płynów ustrojowych podczas wszystkich faz stanu zapalnego przez komórki immunokompetentne lub inne komórki zaangażowane w reakcje odpornościowe (monocyty, makrofagi, śródbłonek, komórki gleju oraz keranocyty) (CAŁKOSIŃSKI i współaut. 2009). Mediatorami informującymi OUN o stanie wzbudzenia układu odpornościowego są między innymi: cytokiny i prostaglandyny (BANKS 2015). Cytokiny stanowią różnorodną rodzinę glikoprotein o charakterze regulatorowym oraz pro- lub przeciwzapalnym. Posiadają stosunkowo dużą masę cząsteczkową, która może dochodzić nawet do około 70 kDa. Wykazują również właściwości hydrofilowe, co wraz z ich dużą masą uniemożliwia im swobodne przenikanie przez barierę krew-mózg (ang. blood-brain barrier, BBB) (DINARELLO 1999, STENKEN i POSCHENRIEDER 2015). Mimo tego według niektórych autorów cytokiny takie jak: IL-1 β , IL-6, TNF- α przekazują do OUN za pośrednictwem kilku mechanizmów informacji o wzbudzeniu komórek odpornościowych. Pierwszym z nich jest oddziaływanie cytokin na neurony, których zakończenia dendrytyczne znajdują się w obrębie narządów okołokomorowych (ang. cricumventricular organs, CVO), gdzie BBB nie funkcjonuje (RIVEST 2010, BIANCARDI i STERN 2016).

Słowa kluczowe: cyklooksygenazy, neuroimmunomodulacja, prostaglandyna E2, układ nerwowy, układ odpornościowy

Drugim jest transport cytokin do OUN przez białkowe transportery błonowe zlokalizowane w BBB (BANKS 2015). Trzecim jest wydzielanie cytokin bezpośrednio do parenchymy mózgu przez wzbudzone komórki mikrogleju (HANSSON 2010). Czwarty mechanizm nie polega bezpośrednio na przenikaniu cytokin do OUN, lecz na wytworzeniu w jego obrębie drugorzędowego mediatora stanu zapalnego - prostaglandyny E₂ (PGE₂) (ANDREASSON 2010).

Przedstawione mechanizmy podkreślają znaczącą rolę cytokin. Warto jednak zauważyć, że podczas rozwoju stanu zapalnego, w humoralnej drodze przekazywania informacji do OUN uczestniczy także szereg innych substancji takich jak: histamina, tlenek azotu i prostaglandyny (CAŁKOSIŃSKI i współaut. 2009). W niniejszym opracowaniu chcielibyśmy przybliżyć rolę PGE₂ w komunikacji pomiędzy układem nerwowym i immunologicznym.

PROSTAGLANDYNY

Prostaglandyny należą do jednej z najważniejszych klas mediatorów lipidowych, eikozanoidów, które są syntetyzowane przy udziale cyklooksygenaz, enzymów związanych z prawidłowym funkcjonowaniem np. żołądka, nerek, układu sercowo-naczyniowego, a także immunologicznego (KOEBERLE i WERZ 2015). Związki te zaangażowane są również w przebieg wielu procesów patofizjologicznych, do których zalicza się: uszkodzenia tkanek, stany zapalne i procesy nowotworzenia (SEO i OH 2017). Synteza prostaglandyn, może zachodzić w każdej komórce organizmu ssaków (FUNK 2001) i jest zależna od aktywności kompleksu enzymatycznego tworzonego przez: fosfolipazę A (PLA), syntazę cyklicznego nadtlenu prostaglandyny H (cyklooksygenazy, COX) oraz syntazę prostaglandyn (mikrosomalnej bądź cytozolowej, PGES). W kontekście komunikacji między układem nerwowym i odpornościowym szczególną uwagę zwraca się w kierunku cy-

klooksygenaz. Jest to grupa enzymów szeroko rozpowszechnionych w tkankach ssaków (ROUZER i MARNETT 2009). Wyróżnia się dwie podstawowe izoformy COX: konstytutywną (COX-1), która jest odpowiedzialna za podstawową syntezę prostaglandyn, oraz indukowaną (COX-2), której aktywność jest specyficzna dla procesów patofizjologicznych m. in. stanów zapalnych (FUNK 2001).

OUN charakteryzuje się konstytutywnym występowaniem obu wspomnianych izoform cyklooksygenaz (CHANDRASEKHARAN i współaut. 2002, MEDEIROS i współaut. 2012). Eksperymenty przeprowadzone na myszach, u których inaktywowano gen odpowiedzialny za syntezę COX-2 wskazują, że enzym ten pełni odmienną funkcję w obrębie OUN niż w tkankach obwodowych (VARDEH i współaut. 2009). W centralnej części układu nerwowego odpowiada głównie za rozwój mechanizmów związanych z nadwrażliwością na ból odczuwany podczas stanu zapalnego (FUNK 2001, VARDEH i współaut. 2009), natomiast obwodowa aktywność COX-2 odnosi się do generowania mechanizmów związanych z fazą ostrą infekcji: indukcji zmian zachowania towarzyszących chorobie (ang. sickness behavior) oraz gorączki (DANTZER 2009, VARDEH i współaut. 2009). Tym samym, według niektórych autorów COX-2 syntetyzuje tzw. „złe” prostaglandyny odpowiedzialne za wystąpienie objawów stanu zapalnego i wzmożone odczuwanie bólu. Przeciwnie właściwości wykazuje COX-1 syntetyzująca tzw. „dobre” prostaglandyny, których główną funkcją jest utrzymywanie homeostazy organizmu (Tabela 1). Doświadczenia wykonane na myszach pozbawionych genu odpowiedzialnego za syntezę COX-1 potwierdzają także zaangażowanie tego enzymu w przebieg stanu zapalnego (FUNK 2001, PARENTE i PERRETTI 2003, VARDEH i współaut. 2009). Funkcje jakie pełni charakterystyczna dla stanów zapalnych PGE₂ są zatem zależne nie tylko od syntetyzującej ją formy COX, ale i określonej lokalizacji w organizmie.

Tabela 1. Wybrane procesy zależne od aktywności COX-1/2. „+” istotny wpływ, „+/-” częściowy wpływ, „-“ brak wpływu (PARENTE i PERRETTI 2003, RICCIOTTI i FITZGERALD 2011).

Proces	COX-1	COX-2
Progresja stanu zapalnego	+/-	+
Odczuwanie bólu (nocycepcja)	+/-	+
Integralność śluzówki żołądkowo-jelitowej	+	-
Filtracja w kłębuszkach nerkowych	+	-
Synteza PGE ₂ przez komórki śródbłonka	+/-	+

Synteza PGE₂ rozpoczyna się od uwolnienia z błony komórkowej kwasu arachidowego (AA). Proces ten zachodzi pod wpływem: uszkodzenia komórki, oddziaływania specyficznej cytokiny, czynnika wzrostu lub innego bodźca, np. obecności bradykininy i trombiny w pobliżu śródbłonka (FUNK 2001). Kluczowym enzymem odpowiedzialnym za uwolnienie AA z błony komórkowej jest cytozolowa fosfolipaza A₂ podtypu IV (cPLA₂) (FUNK 2001, SEO i OH 2017). Uwolniony podczas stanu zapalnego AA jest wykorzystywany przez syntazę prostaglandyny H (PGHS-2, nazywanej również cyklooksygenazą 2, COX-2) (FUNK 2001, ALEXANIAN i SOROKIN 2017). Powstająca tam PGH₂ zostaje przekształcona przez mikrosomalną syntazę prostaglandyny E2 (mPGES) do ostatecznej formy – PGE₂ (SEO i OH 2017). Mimo że jest to szlak wiodący i charakterystyczny dla procesów zapalnych, nie jest on jedynym prowadzącym do powstania cząsteczki PGE₂. Synteza omawianego mediatora może odbywać się również z udziałem COX-1 i cytozolowej syntazy prostaglandyny E2 (cPGES) np. w żołądku (PARK i współaut. 2006). Wyniki doświadczeń WU i NAKANISHI (2011) dostarczają danych świadczących o zależnym od COX-1/mPGES wzroście metabolizmu i sekrecji PGE₂ w OUN. Mechanizm ten indukowany jest w komórkach mikrogleju w odpowiedzi na obecność liposomów zawierających fosfatydyloserynę, która stanowi element strukturalny wewnętrznej części błony komórkowej (WU i NAKANISHI 2011). Uwolniona poza komórkę, może indukować rozpoznawanie i wychwytywanie komórek apoptotycznych przez makrofagi, co świadczy o potencjalnym wpływie związków proapoptotycznych na aktywność cyklooksygenaz (WU i NAKANISHI 2011).

Jak już wspomniano, PGE₂ jest syntetyzowana z AA uwolnionego podczas uszkodzenia tkanek, np. w skutek aktywności patogenów. Ze względu na swoje lipidowe pochodzenie, a co za tym idzie, silnie hydrofobowy charakter, prostaglandyny mogą swobodnie przenikać przez błony komórkowe (YANG i CHEN 2008), co czyni je istotnymi nośnikami niespecyficznej informacji o uszkodzeniu komórek. Ponadto, cząsteczki PGE₂ mogą przekraczać błonę komórkową na drodze transportu aktywnego, przy udziale specyficznych dla prostaglandyn transporterów białkowych (FUNK 2001, NAKANISHI i TAMAI 2017). Kiedy PGE₂ zostanie wydzielona z produkującej ją komórki, może wpływać na aktywność komórek układu odpornościowego. W konsekwencji wydzielają one szereg związków niezbędnych do zainicjowania procesów prozapalnych w miejscu infekcji, m.in. chemokin, cytokin, ale również kolejnych porcji PGE₂,

wydzielanej zwłaszcza przez makrofagi. Związki te trafiają do płynów ustrojowych, w tym do krwiobiegu, gdzie PGE₂ jako element drogi humoralnej bierze udział w przekazywaniu do OUN sygnału o wzbudzeniu układu odpornościowego (ABDULKHALEQ i współaut. 2018). Cząsteczki PGE₂ transportowane za pośrednictwem układu krwionośnego docierają do BBB, a następnie przekraczają ją i wnikają do parenchymy mózgu (AKANUMA i współaut. 2011, SAPER i współaut. 2012).

Warto ponownie zwrócić uwagę na właściwości fizykochemiczne PGE₂, ponieważ z racji małego rozmiaru cząsteczki oraz właściwości hydrofobowych, PGE₂ może swobodnie przenikać nie tylko przez błony komórkowe, ale i takie bariery organizmu, jak BBB (DANTZER i współaut. 2000). O roli PGE₂ w wymianie informacji między układem nerwowym i immunologicznym świadczy fakt, iż w obrębie BBB występują również specyficzne transportery białkowe umożliwiające jej bezpośredni kontakt z tkanką nerwową (KIS i współaut. 2006). Ponadto, podobnie do cytokin, PGE₂ może oddziaływać na OUN poprzez CVO. Dowodem potwierdzającym to założenie jest wynik eksperymentu OOTSUKA i współaut. (2008). Wykluczyli oni możliwość przekazywania sygnału zapalnego z obwodu organizmu do OUN przez nerw błędny przez jego chirurgiczne przecięcie w odcinku szyjnym (wagotomia szyjna). Zarejestrowali, że dożylna iniekcja PGE₂ indukuje gorączkę, oddziałując na ośrodek termogenezy w OUN, który znajduje się w obrębie pola przedwzrokowego (łac. *area preoptica*, POA) podwzgórze (OOTSUKA i współaut. 2008, SHINPO i współaut. 2012, KIECKER 2017).

W ramach komunikacji odpornościowo-nerwowej, PGE₂ pełni również rolę mediatora drugorzędowego. Cytokiny uwolnione do krwiobiegu podczas wczesnych etapów rozwoju stanu zapalnego oddziałują bowiem na komórki BBB, indukując w śródbłonku naczyń włosowatych mózgu aktywność COX-2. Skutkuje to wzmożoną syntezą i uwalnianiem tego związku do parenchymy mózgu (RIVEST 2010, MEDEIROS i współaut. 2012). Ponadto, cytokiny prozapalne (np. IL-1β) mają zdolność do stymulowania aktywności cyklooksygenazy nie tylko w śródbłonku, lecz także w samym OUN (DINARELLO 2002, MEDEIROS i współaut. 2012, WANG i współaut. 2014).

Jak już wspomniano, praktycznie wszystkie narządy zawierają komórki wyposażone w specyficzne białka enzymatyczne odpowiedzialne za syntezę PGE₂ (MEDEIROS i współaut. 2012, LOYNES i współaut. 2018). Na uwagę zasługuje jednak fakt, iż w OUN stale utrzymywane jest niewielkie stężenie prostaglandyn takich jak: PGE₂, PGD₂ i PGF₂,

co prawdopodobnie odpowiada za efektywniejszą reaktywność OUN w stosunku do czynników zaburzających stan homeostazy organizmu (VARDEH i współaut. 2009, MEDEIROS i współaut. 2012).

RECEPTORY SPECYFICZNE DLA PGE₂

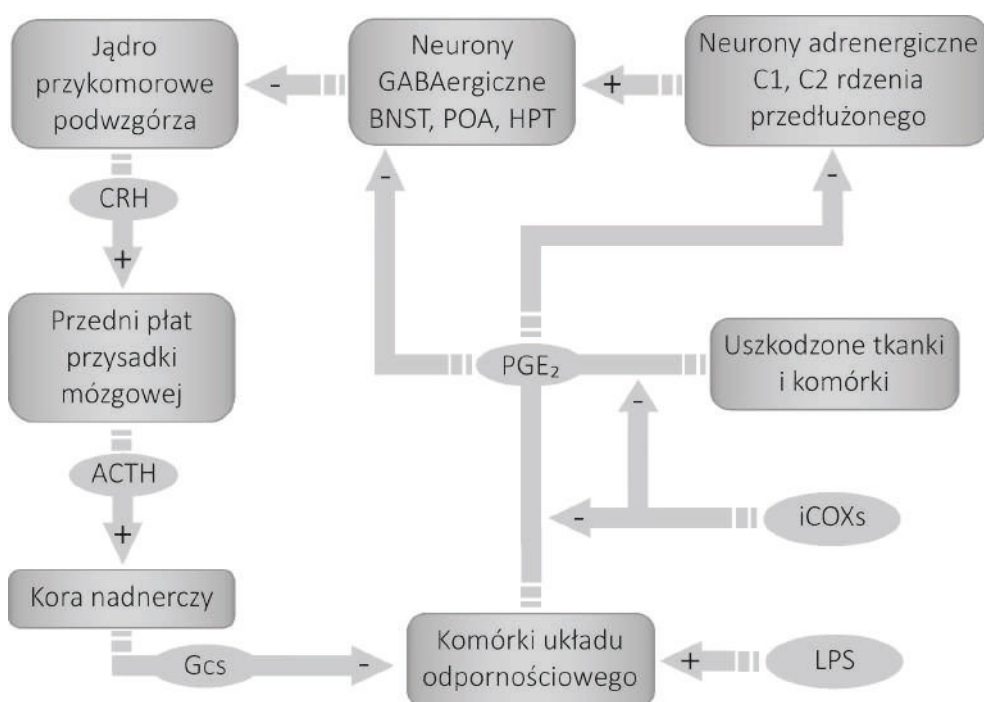
Po przejściu przez BBB, PGE₂ funkcjonuje jako neuromodulator i tym samym wpływa na odpowiedź OUN na zagrożenia panujące na obwodzie (DANTZER i współaut. 2000). Jest to możliwe dzięki oddziaływaniu tej cząsteczki ze specyficznymi receptorami rozmieszczonymi w określonych regionach OUN (ANDREASSON 2010). Poszczególne struktury OUN charakteryzują się występowaniem odmiennych podtypów receptorów dla PGE₂, a dodatkowo, gęstość ich występowania jest niejednorodna (ZHU i współaut. 2005, ANDREASSON 2010). Potwierdzono istnienie czterech podtypów receptorów, z którymi PGE₂ łączy się specyficznie (EP1-EP4). Zaliczane są one do rodziny przęzblonowych receptorów metabotropowych sprzężonych z białkami G. Po połączeniu z ligandem wpływają na szlaki przekazywania sygnału w komórce (YANG i CHEN 2008). Receptory EP za pośrednictwem białek G wpływają głównie na aktywność cykazy adenylanowej i kanałów wapniowych (SUGIMOTO i NARUMIYA 2007). Ze względu na sposób transdukcji sygnału podzielono je na 3 grupy. Do pierwszej z nich zaliczany jest receptor EP1, którego aktywność wpływa na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺. Drugą grupę stanowią receptory EP2 i EP4, które po aktywacji ligandem powodują wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP. Wszystkie te receptory zostały wykryte w zakończeniach synaptycznych (ZHU i współaut. 2005, YANG i CHEN 2008), co sugeruje ich zaangażowanie w synaptyczne procesy związane z neurotransmisją (YANG i CHEN 2008). Ostatnia grupa reprezentowana jest przez receptor EP3, którego aktywacja prowadzi do spadku wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, a w konsekwencji hamowania aktywności komórki (RIVEST 2010). Wysoką ekspresję tego podtypu receptora EP odnotowano w odpowiedzialnym za genezę gorączki polu przedwzrokowym (LAZARUS 2006). Wykazano, że PGE₂ indukuje gorączkę związaną ze stanem zapalnym właśnie za pośrednictwem receptorów EP3 zlokalizowanych w tym obszarze OUN. Warto nadmienić, że do indukcji gorączki dochodzi w momencie zmiany charakteru stanu zapalnego, z lokalnego na ogólnoustrojowy (BLATTEIS 2007, TSUCHIYA i współaut. 2008, KIECKER 2017). Doświadczenie przeprowadzone przez TSU-

CHIYA i współau. (2008) wykazało, że u myszy pozbawionych receptorów EP3 gorączka nie rozwija się ani po obwodowym podaniu IL-1β lub lipopolisacharydu (LPS), elementu ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, ani po ośrodkowym podaniu IL-1β lub PGE₂ (TSUCHIYA i współaut. 2008, RAJAGOPALAN i współaut. 2009).

Receptory EP3 i EP4 mają wyższe powinowactwo do PGE₂, co oznacza, że wymagają znacznie niższego stężenia ligandu niż EP1 i EP2, aby uruchomiona została specyficzna dla nich kaskada sygnalizacyjna (LAZARUS 2006, SANDER i współaut. 2017). Dane eksperymentalne uzyskane przez OKA i współaut. (2003) dostarczyły dowodów na występowanie wzajemnego antagonizmu pomiędzy receptorami EP3 i EP4. Autorzy badali wpływ dokomorowych iniekcji wysoko specyficznymi agonistami badanych receptorów na zmiany temperatury organizmu. Zaobserwowali, że aktywacja receptora EP3 spowodowała wzrost temperatury organizmu o 1,0-1,5°C, podczas gdy aktywacja receptora EP4 spadek temperatury o 0,5°C. Badania funkcji receptorów EP3 i EP4 potwierdzają ich antagonistyczny charakter oraz pokazują, że temperatura organizmu stanowi wypadkową ich aktywności (OKA i współaut. 2003, LAZARUS 2006).

ODPOWIEDŹ OUN NA OBWODOWY STAN ZAPALNY

Ośrodkowy układ nerwowy pełni niezwykle istotną rolę podczas infekcji obwodowej, koordynując pracę wszystkich systemów zaangażowanych w efektywną odpowiedź układu odpornościowego (SKOWRON-CENDRZAK 1993). W pierwszych etapach infekcji dochodzi do aktywacji komórek układu odpornościowego. Wydzielają one do krwiobiegu mediatorzy stanu zapalnego, są to np. cytokiny lub PGE₂. Gdy OUN otrzyma sygnał o toczącym się na obwodzie procesie zapalnym, uruchamia mechanizmy przeciwzapalne takie jak odruch zapalny (ang. inflammatory reflex), którego elementem jest cholinergiczna ścieżka przeciwzapalna (TRACEY 2007), a także aktywacja osi podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy (ang. hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA) (DUNN 2006). Mediatorzy prozapalne, takie jak cytokiny prozapalne oraz prostaglandyny (z wyjątkiem PGD₂), uwalniane do płynów ustrojowych podczas infekcji wpływają również na funkcjonowanie samego OUN (RIVEST 2010). Zdaniem niektórych autorów PGE₂ oddziałuje na aktywność układów neurotransmisyjnych (YANG i CHEN 2008). Badania Dunna dowodzą, że dootrzewnowa iniekcja IL-1β powoduje w OUN wzrost stężenia głównego katabolitu nora-



Ryc. 1. Udział inhibitorów COX w hamowaniu procesu pośredniej aktywacji osi podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy przez prostaglandynę E2.

CRH – kortykoliberyna, ACTH – kortykotropina, Gcs – glikokortykoidy, PGE₂ – prostaglandyna E2, iCOX – inhibitory cyklooksygenaz, LPS – lipopolisacharyd, BNST – neurony GABAergiczne jądra łożyskowego prążka krańcowego (łac. *nucleus striae terminalis*, BNST), POA – neurony GABAergiczne pola przedwzrokowego (łac. *area preoptica*, POA), HPT – neurony GABAergiczne podwzgórza (łac. *hypothalamus*).

drenaliny, którym jest 3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikol (MHPG), przy czym największy wzrost stężenia MHPG zaobserwowany został w podwzgórzu (łac. *hypothalamus*, HPT). Wskazuje to, że właściwości IL-1 β pozwalają na wzbudzenie układu noradrenergicznego w podwzgórzu, co bezpośrednio wiąże się z aktywacją osi HPA (DUNN 1988, 2006). Okazuje się jednak, że oś HPA może zostać aktywowana również za pośrednictwem PGE₂ (RIVEST 2010). PGE₂ jako jeden z mediatorów stanu zapalnego, oddziałuje z receptorami EP3 zlokalizowanymi na neuronach GABA-ergicznym: jądra łożyskowego prążka krańcowego (łac. *nucleus striae terminalis*, BNST), pola przedwzrokowego i podwzgórza, wywierających hamujący wpływ na początkowy element osi HPA, czyli jądro przykomorowe podwzgórza (łac. *nucleus paraventricularis*, PVN). PGE₂ łączy się również z receptorami EP3 związanymi z grupami neuronów adrenergicznych C1 jądra pasma samotnego (łac. *nucleus tractus solitarii*, NTS) oraz C2 rdzenia przedłużonego (łac. *medulla oblongata*), stymulujących aktywność wspomnianych wcześniej neuronów GABA-ergicznym. Efektem tych oddziaływań jest odhamowanie aktywności PVN, które zaczyna uwalniać kortykoliberynę (CRH), hormon inicjujący przeciwwzapalną aktywność osi HPA

(HERMAN i współaut. 2004, RIVEST 2010). W konsekwencji PGE₂ pośrednio reguluje sekrecję glikokortykoidów z kory nadnerczy, co istotnie moduluje aktywność komórek układu odpornościowego, np. podczas trwającego stanu zapalnego (Ryc. 1). Działanie PGE₂ nie ogranicza się jedynie do oddziaływania na układ noradrenergiczny w obrębie osi HPA. MARTY i współaut. (2008) wykazali, że PGE₂ stymuluje aktywność układu glutaminergicznego w NTS, struktury, która uczestniczy w przekazywaniu znacznej liczby sygnałów czuciowych, m.in. z nerwu błędnego, które następnie docierają do wyższych piętér OUN. Na uwagę zasługuje również fakt występowania interakcji pomiędzy układem dopaminergicznym i PGE₂. KITAOKA i współaut. (2007) w badaniach *in vitro* wykazali, że aktywacja receptorów D1-2 zlokalizowanych na neuronach dopaminergicznym skutkuje wzmożoną syntezą PGE₂. Z drugiej strony, PGE₂ przez oddziaływanie z receptorem EP1 na powierzchni neuronów dopaminergicznym wpływa na wzmocnienie transmisji dopaminergicznym. Dane te uzyskano analizując zależności między układem dopaminergicznym i prostaglandyną E2 w skrawkach prążkowiak (łac. *striatum*), struktury OUN regulującej funkcje ruchowe, poznawcze i emocjonalne (KITAOKA i współaut. 2007). Ciekawe obser-

wacje odnośnie PGE₂ i układu dopaminergicznego przedstawili KOBRZYCKA i współaut. (2019). Autorzy zaobserwowali, że przecięcie nerwu błędnego, elementu neuronalnej drogi komunikacji układu odpornościowego z OUN, skutkuje wzrostem metabolizmu w wielu strukturach mózgowia, również tych należących do układu limbicznego. Warto nadmienić, że podczas rozwijającej się infekcji u zwierząt poddanych wspomnianemu zabiegowi, poziom PGE₂ w osoczu był znacznie wyższy niż u zwierząt kontrolnych, a podniesiony wcześniej metabolizm dopaminy uległ normalizacji (KOBRZYCKA i współaut. 2019). Autorzy zasugerowali również, że zwiększony poziom PGE₂ podczas infekcji może być swoistym mechanizmem kompensującym brak możliwości detekcji patogenów i molekuł z nimi związanych. Jednocześnie może on kompensować brak regulacyjnych, względem układu odpornościowego, funkcji nerwu błędnego, który może pojawiać się w takich sytuacjach jak neuropatie cukrzycowe (KOBRZYCKA i współaut. 2019).

Wpływ PGE₂ na działanie układu neuroendokrynnego i szlaków neurotransmisyjnych, zwłaszcza w obrębie struktur układu limbicznego związanych z kontrolą stanów emocjonalnych, znajduje potwierdzenie również w zachowaniu chorych zwierząt. Występujący podczas choroby zespół specyficznych zachowań i objawów takich jak: obniżenie aktywności lokomotorycznej, zmniejszenie ilości pobieranych płynów i pokarmu, nadwrażliwość na ból, brak odczuwania przyjemności, określone wspólnym mianem sickness behavior (zachowania chorobowe), koreluje ze zwiększonym stężeniem PGE₂ w OUN (SOSZYŃSKI 2004, KITAOKA i współaut. 2007, PECCHI i współaut. 2009). Zaangażowanie COX oraz jej produktów w genezę sickness behavior potwierdzają również dane uzyskane przez DE PAIVA i współaut. (2010). Badacze ci zaobserwowali, że dootrzewnowa iniekcja nieselektywnego (indometacyna) i selektywnego (nimesulid) inhibitora COX-2 zapobiega wystąpieniu sickness behavior spowodowanego podaniem LPS. Wśród zwierząt, które otrzymywały inhibitory COX podanie LPS nie spowodowało: obniżenia aktywności lokomotorycznej, zmniejszenia ilości pobieranego pokarmu i obniżenia masy ciała.

Wzrost stężenia PGE₂ podczas rozwoju stanu zapalnego jest ściśle związany nie tylko z lokalnym uszkodzeniem komórek i aktywacją komórek odpornościowych, ale też ze wspomnianą już ośrodkową indukcją gorączki i pogorszeniem samopoczucia. PGE₂, syntetyzowaną w odpowiedzi na czynniki prozapalne, należy bowiem wiązać również z odczuwaniem bólu (nocycepcją). Nocycepcja i stan zapalny to procesy ściśle związane ze

wzmożoną aktywnością cyklooksygenaz, zarówno formy konstytutywnej (COX-1), jak i indukowanej (COX-2) (GRÖSCH i współaut. 2017). PGE₂ jest dobrze poznanym mediatorem bodźców nocyceptywnych, co więcej, pełni kluczową rolę w powstawaniu stanów przewlekłego bólu. Powodowane przez PGE₂ przedłużające się uwrażliwienie neuronów znajdujących się w nocyceptywnym zwoju korzeni grzbietowych (ang. dorsal root ganglion, DRG) może przyczynić się do przejścia formy ostrej bólu w formę przewlekłą. Dodatkowo, długotrwałe oddziaływanie PGE₂ na DRG może doprowadzić do wystąpienia zjawiska allodynii, czyli stanu, w którym organizm odczuwa ból w odpowiedzi na bodźce z nim nie związane (ST-JACQUES i MA 2014). Badania ST-JACQUES i MA (2014) wskazują istotne zaangażowanie PGE₂ w procesy związane z uwrażliwieniem organizmu na bodźce bólowe. W swoim doświadczeniu wykazali, że po podaniu stabilnej formy PGE₂ (16,16-dimetylo-PGE₂, dmPGE₂) u szczurów rozwija się allodynia, trwająca 24h. Natomiast w przypadku premedykacji dmPGE₂ i kolejnym podaniu dawki wywołującej allodynię, efekt zjawiska utrzymywał się 4 dni.

REGULACJA AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ CYKLOOKSYGENAZ

Głównym źródłem prostanoidów w OUN jest tkanka glejowa. Początkowo uważano, że niemal wszystkie prostanoidy w OUN są syntetyzowane i uwalniane przez astrocyty, jednak późniejsze badania wykazały, że to mikroglej odpowiada za uwalnianie do parenchymy mózgu większej ilości tych związków (MEDEIROS i współaut. 2012). Dominujący udział mikrogleju w ośrodkowej syntezie PGE₂ potwierdza fakt, iż w aktywowanym dootrzewnowym podaniem LPS mikrogleju zaobserwowano szczególnie zwiększoną ilość enzymu COX-2 (MINGHETTI i LEVI 1998, MINGHETTI i POCCHIARI 2007). LPS nie jest jednak jedynym czynnikiem regulującym poziom syntetyzowanej PGE₂. Istnieje bowiem szereg endogennych substancji, które wpływają na aktywność enzymów związanych z syntezą PGE₂. W obrębie OUN potwierdzono obecność czynników wywierających wpływ na aktywność COX-2. Są to między innymi hormony stresu, glikokortykoidy (LEVI i współaut. 1998, MASON i współaut. 2010), oraz mediatory o charakterze przeciwzapalnym, których przykładem jest IL-10 (LEVI i współaut. 1998, STRLE i współaut. 2001). Dodatkowo, do czynników regulujących aktywność COX-2 zalicza się lipokortynę, białko, które hamuje syntezę PGE₂ przez blokowanie aktywności fosfolipazy A₂, enzymu limitującego liczbę cząsteczek kwasu arachi-

donowego uwalnianych z błony komórkowej (LEVI i współaut. 1998, MINGHETTI i współaut. 1999). Wszystkie wymienione związki wpływają negatywnie na aktywność COX-2. Działanie przeciwne wykazują cytokiny prozapalne: TNF- α i IL-1 β (LEVI i współaut. 1998, NAM i współaut. 2003, BLATTEIS i współaut. 2005), oraz neuroprzekaźniki: noradrenalina i glutaminian (STRAUSS 2008, SCHLACHETZKI i współaut. 2010). Ciekawa interakcja zachodzi również między jednym z końcowych produktów aktywności COX-2 a nią samą. Okazuje się bowiem, że PGE₂ pełni rolę pozytywnego regulatora aktywności COX-2 (MINGHETTI i współaut. 1997).

Wiadomo również, że w środowisku zewnętrznym organizmu występują substancje stymulujące aktywność cyklooksygenaz i tym samym wpływające na zwiększenie produkcji PGE₂. Dobrze poznanym egzogennym związkiem wykazującym takie działanie jest LPS. Warto nadmienić, iż jego oddziaływanie nie ogranicza się jedynie do indukowania aktywności COX-2, lecz dodatkowo prowadzi do podniesienia jej ekspresji, np. w komórkach nabłonkowych zaangażowanych w procesy odpornościowe (BRITT i współaut. 2012). Kolejnym egzogennym związkiem oddziałującym na ekspresję genów dla COX-2 jest enterotoksyna gronkowca B (ang. staphylococcal enterotoxin B, SEB). Związek ten jest syntetyzowany przez niektóre bakterie Gram-dodatnie i zaliczany do superantygenu. Powoduje on wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę COX-2 w mysich limfocytach T (RAJAGOPALAN i współaut. 2009).

Oprócz wspomnianych już regulatorów aktywności cyklooksygenaz, zarówno endo-, jak i egzogennych, istnieje szereg substancji zaliczanych do grupy tzw. niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Substancje te stanowią grupę egzogennych związków hamujących syntezę PGE₂ przez ograniczenie aktywności COX. W konsekwencji, NLPZ wykazują działanie nie tylko przeciwzapalne, ale też przeciwbólowe i przeciwgorączkowe. Klasyfikacji NLPZ można dokonać w oparciu o powinowactwo do określonych form cyklooksygenaz. Na tej podstawie wyróżnia się nieselektywne i selektywne inhibitory COX (Tabela 2). Związki należące do pierwszej grupy hamują aktywność zarówno COX-1, jak i COX-2. Związki zaliczane do drugiej grupy charakteryzują się natomiast selektywnym hamowaniem aktywności COX-2 lub częściowo selektywnym hamowaniem COX-1 (BOTTING 2010, CARULLO i współaut. 2017). NLPZ są szczególnie ważne, ponieważ, ze względu na ich szerokie rozpowszechnienie oraz brak wymogu posiadania recepty, stanowią grupę leków najczęściej stosowa-

nych obecnie w medycynie. W wyniku tego, wśród ludności krajów rozwiniętych, obserwuje się zjawisko epidemii nadużywania NLPZ. Blisko 35 milionów ludzi na całym świecie codziennie stosuje te leki, co stanowi poważne zagrożenie; u wielu osób NLPZ mogą one wywoływać reakcje nadwrażliwości, a ponadto mogą wchodzić w reakcje z innymi lekami (KOWALSKI i współaut. 2011, REGUŁA i współaut. 2011). Nadużywanie, w szczególności nieselektywnych inhibitorów COX, prowadzi może do wystąpienia objawów niepożądanych, a następnie do rozwoju licznych chorób (ABBOTT i FRASER 1998, FOKUNANG i współaut. 2018). Jak się okazuje, długotrwałe hamowanie aktywności COX-1 powoduje uszkodzenie błony śluzowej żołądka, co z kolei stanowi korzystne środowisko dla rozwoju choroby wrzodowej. W przypadku nerek, przewlekłe stosowanie inhibitorów COX-1 wywołuje zmiany hemodynamiczne, które mogą wywoływać ich niewydolność. W układzie sercowo-naczyniowym przewlekła inhibicja aktywności COX-1 prowadzi do powstania zmian naczyniowych skutkujących nadciśnieniem, obrzękiem, a nawet niewydolnością serca (WALLACE 2000, FOKUNANG i współaut. 2018). Przewlekłe hamowanie aktywności COX-2 przez selektywne formy inhibitorów może również prowadzić do wystąpienia efektów niepożądanych, a nawet chorób. Wynika to z faktu, iż związki te hamują aktywność COX-2, której obecność potwierdzono w niektórych narządach wewnętrznych (np. w nerkach). Zatem objawy niepożądane występujące podczas stosowania selektywnych inhibitorów COX-2 są prawdopodobnie wynikiem hamowania syntezy PGE₂ w obszarach organizmu, w których pełni ona funkcje homeostatyczne. Oczywiście ryzyko wystąpienia takich efektów jest znacznie mniejsze niż w przypadku przewlekłego stosowania form nieselektywnych (HARRIS 2000, WRIGHT 2002, SHAHRASBI i współaut. 2018).

Badania przeprowadzone przez WOODLING i współaut. (2016) dostarczają danych potwierdzających wpływ stosowania nieselektywnych inhibitorów COX na układy neurotransmisyjne w OUN. Wykorzystując chromatografię cieczową wykazali, że długotrwałe podawanie ibuprofenu powoduje istotny wzrost stężenia dopaminy w formacji hipokampa myszy. Dodatkowo, przeprowadzając analizy z wykorzystaniem mikromacierzy cDNA i metody real-time qPCR potwierdzili, że długotrwałe stosowanie ibuprofenu skutkuje wzrostem ekspresji genów kodujących receptor dopaminowy D1 oraz peptyd prekursorowy met-enkefaliny – pre proenkefaliny. Analiza danych pozyskanych przez LIN i współaut. (2014) także potwierdza istnie-

Tabela 2. Wpływ wybranych inhibitorów cyklooksygenaz na aktywność COX-1/2 (wg PERRONE i współaut. 2010, RIMON i współaut. 2010, WOROŃ i współaut. 2011, SAMBORSKI i współaut. 2017).

Inhibitory	Opis	Substancja
Częściowo selektywne inhibitory COX-1	Charakteryzujące się istotnie wyższym powinowactwem do COX-1 niż do COX-2.	SC-560, FR122047, kwas acetylosalicylowy (w małych dawkach)
Nieselektywne inhibitory COX-1	Wykazujące wyższe powinowactwo do COX-1 niż do COX-2.	ibuprofen, ketaprofen, naproksen, indometacyna
Preferencyjne inhibitory COX-2	Wykazujące wyższe powinowactwo do COX-2 niż do COX-1.	meloksykam, nimesulid
Selektywne inhibitory COX-2	Charakteryzujące się około 200 razy wyższym powinowactwem do COX-2 niż do COX-1.	celekoksyb, parekoksyb, etorykoksyb

nie zależności pomiędzy stosowaniem inhibitorów COX a zmianą aktywności układów neurotransmisyjnych. Autorzy opisali hamujący wpływ selektywnego inhibitora COX-2 (celekoksybu) na uwalnianie glutaminianu przez zakończenia nerwowe w korze mózgu szczura. Wyniki uzyskane przez WOODLING i współaut. (2016) oraz LIN i współaut. (2014) wskazują na zależność między zablokowaniem syntezy PGE₂ a zmianą aktywności układów neurotransmisyjnych, dopaminergicznego i glutaminergicznego. Pozwala to przypuszczać, iż inaktywacja szlaku sygnałowego drogi humoralnej (szlak PGE₂/COX) może prawdopodobnie indukować zmiany funkcjonalne w drodze alternatywnej – neuronalnej. Przypuszczenie to potwierdzają dane dotyczące wpływu inhibitorów COX na NTS. Zahamowanie aktywności COX-2 podczas trwającego na obwodzie stanu zapalnego nie zapobiega bowiem wzrostowi ekspresji białka c-Fos, markera aktywności neuronów, w NTS, jądrze czuciowym nerwu błędnego. Okazuje się jednak, że inhibicja aktywności COX-1 w tej samej sytuacji powoduje zablokowanie wzrostu ekspresji białka c-Fos w NTS (ZHANG i współaut. 2003). Świadczy to o zaangażowaniu PGE₂ w regulację procesów związanych z detekcją patogenów zachodzących za pośrednictwem wstępujących włókien czuciowych nerwu błędnego. Dodatkowo wyniki eksperymentu ZHANG i współaut. (2003) potwierdzają wpływ PGE₂ na aktywność neuronów związaną bezpośrednio z aktywnością układów neurotransmisyjnych (FLAVELL i GREENBERG 2008). W celu poparcia tego założenia porównano dane pochodzące z doświadczenia ZHANG i współaut. (2003), WOODLING i współaut. (2016) oraz LIN i współaut. (2014). Dane te korelują ze sobą i pokazują, że PGE₂ wpływa zarówno na ekspresję białka c-Fos, jak i aktywność

układu dopaminergicznego i glutaminergicznego.

Możliwość występowania interakcji pomiędzy drogą neuronalną i humoralną sugeruje prawdopodobne istnienie swoistych mechanizmów odpowiedzialnych za przejmowanie funkcji uszkodzonej drogi przez tę, która jest w pełni sprawna (WOODLING i współaut. 2016, KOBRZYCKA 2017).

COX-2 I CHOROBY O PODŁOŻU NEURODEGENERACYJNYM

Współczesne badania coraz częściej wskazują na istotną rolę COX-2 i jej produktów w patogenezie wielu chorób zwierząt (FITZGERALD 2003, MAINGRET i współaut. 2017, IKEDA-MATSUO 2019). Patologiczne zmiany ekspresji tego enzymu są obserwowane w przypadku chorób zlokalizowanych zarówno na obwodzie, jak i w centralnej części układu nerwowego (FITZGERALD 2003, MINGHETTI i POCCHIARI 2007). Okazuje się, że zwiększony poziom białka COX-2 oraz zwiększona synteza PGE₂ w OUN zostały opisane w chorobach: Alzheimer (AD), Parkinson (PD) i stwardnieniu rozsianym (SM) (TEISMANN i współaut. 2003, MAINGRET i współaut. 2017, PALUMBO 2017). Badania JOHANSSON i współaut. (2015) wskazują, że szlak COX-2/PGE₂, wraz z aktywacją receptorów EP4, odgrywa istotną rolę w rozwoju AD. Stan zapalny indukowany przez PGE₂ stymuluje powstawanie białkowych złogów β-amyloidu, stanowiących czynnik toksyczny dla OUN w przebiegu tej choroby (HOSHINO i współaut. 2009, JOHANSSON i współaut. 2015). W przypadku PD zwiększona ilość COX-2 koreluje z charakterystycznymi obszarami objętymi procesami neurodegeneracyjnymi. Prawdopodobnie, zwiększona synteza PGE₂ w obrębie struktur szlaku czarno-prądkowatego nasila ich uszkodzenia będące wynikiem postępują-

cych procesów neurodegeneracyjnych w PD (TEISMANN i współaut. 2003, IKEDA-MATSUO 2019). Również podczas pośmiertnych badań mózgu pacjentów z SM stwierdzono zmiany dotyczące aktywności szlaku COX-2/PGE₂; zwiększona aktywność COX-2 została opisana w częściach OUN objętych aktywnym procesem demielinizacyjnym i w umierających oligodendrocytach (CARLSON i współaut. 2010, PALUMBO 2017). Opisane mechanizmy wskazują, że zwiększona aktywność COX-2 jest elementem wspólnym dla AD, PD, SM, co uzasadnia fakt stosowania NLPZ w terapii przedstawionych chorób neurodegeneracyjnych mózgu (JOHANSSON i współaut. 2015, PALUMBO 2017, REN i współaut. 2018). Zwiększona ilość COX-2 i wzmożona synteza PGE₂ stanowią potencjalne czynniki współodpowiedzialne za rozwój i progresję chorób neurodegeneracyjnych. Zidentyfikowanie czynników wpływających na wzrost syntezy PGE₂ umożliwi prawdopodobnie skuteczniejszą terapię wyżej wymienionych chorób.

PODSUMOWANIE

Przedstawione informacje i wyniki badań pozwalają na sformułowanie hipotezy dotyczącej komunikowania się układu odpornościowego z OUN. Współdziałanie układu odpornościowego z OUN wymaga istnienia wyspecjalizowanych mechanizmów zapewnianych skuteczną wymianę informacji pomiędzy nimi. Dlatego organizm zwierząt, w tym człowieka, jest zdolny do syntezy i wydzielania do płynów ustrojowych szeregu związków sygnałowych. Do ich detekcji dochodzi za pośrednictwem specyficznych dla nich receptorów obecnych na komórkach obu układów. Niezwykle istotnymi dla procesu komunikacji między omawianymi układami są produkty aktywności enzymatycznej COX-2, w szczególności PGE₂ (DANTZER i współaut. 2000). Powszechnie występowanie COX-2 zapewnia możliwość syntezy PGE₂ w każdej tkance organizmu objętej działaniem czynnika szkodliwego. Wskazuje to na uniwersalną rolę PGE₂ w generowaniu informacji o zagrożeniu homeostazy organizmu (MEDEIROS i współaut. 2012, LOYNES i współaut. 2018). Hydrofobowy charakter oraz obecność transporterów białkowych w błonach komórkowych powodują, że cząsteczka PGE₂ charakteryzuje się silną penetracją wszelkich barier organizmu (KIS i współaut. 2006, BANKS 2015). Ponadto, w celu przekazania informacji do OUN wykorzystuje również pośrednie mechanizmy przenikania przez BBB. Jest to między innymi indukcja aktywności COX-2 w śródbłonku, czego następstwem jest synteza i uwolnienie kolejnych porcji PGE₂ do parenchymy mózgu (MINGHETTI i współaut.

1997). Kolejnym pośrednim mechanizmem pokonywania BBB jest oddziaływanie na komórki nerwowe w obrębie narządów okołokomorowych (BLATTEIS i współaut. 2005). Następstwem kontaktu cząsteczki PGE₂ z neuronami jest przekazanie informacji o działaniu czynnika szkodliwego. Odbywa się to za pośrednictwem specyficznych dla PGE₂ receptorów EP zlokalizowanych na komórkach nerwowych (LAZARUS 2006, SANDER i współaut. 2017). Ich obecność potwierdzono w wielu strukturach OUN związanych z wykrywaniem obecności patogenów lub wpływających na pracę układu odpornościowego: POA, PVN, CVO i centralnym jądrze ciała migdałowatego (PECCHI i współaut. 2009, ANDREASSON 2010). Zależnie od typu aktywowanego receptora EP, efekt działania PGE₂ może obejmować spadek lub wzrost aktywności komórki nerwowej (RIVEST 2010). Konsekwencją hamowania aktywności komórek nerwowych za pośrednictwem receptorów EP3 w POA jest geneza gorączki (BLATTEIS 2007, KIECKER 2017). Jest to skuteczny mechanizm walki z infekcją, który nie tylko ogranicza wzrost i rozwój patogenów, ale i stymuluje proliferację komórek odpornościowych (PECCHI i współaut. 2009). W odpowiedzi na stan zapalny, dochodzi do wzrostu stężenia PGE₂ w obrębie OUN. Sygnał ten indukuje zmniejszenie ilości pobieranego pokarmu i depresję behawioralną, jedne z głównych elementów sickness behavior (DANTZER 2009, PECCHI i współaut. 2009). Dowodem na zaangażowanie PGE₂ w indukcję wspomnianych mechanizmów obronnych jest fakt, iż stosowanie selektywnych inhibitorów COX-2 osłabia ich przebieg lub nawet zapobiega ich uruchomieniu (BLATTEIS i współaut. 2005, PECCHI i współaut. 2009). Ponadto, badania ZHANG i współaut. (2003) wskazują na odmienną rolę 1 i 2 izoformy cyklooksygenazy w przekazywaniu sygnału o stanie zapalnym do OUN i indukcji c-Fos w obrębie NTS. Reasumując, PGE₂ jest niezwykle ważnym nośnikiem informacji między wzbudzonym układem odpornościowym a OUN. Wykazuje wiele właściwości pozwalających jej na skuteczne przekazywanie informacji o zaburzeniu homeostazy organizmu. OUN posiada specyficzne receptory w strukturach odpowiedzialnych za procesy związane z wykrywaniem obecności patogenów oraz regulujących aktywność układu odpornościowego, co wskazuje, że PGE₂ posiada zdolność do modulowania aktywności tych obszarów. Co więcej, wykazuje ona również wpływ na aktywność całych układów neurotransmisyjnych, czego efektem może być indukcja zmian dotyczących innych obszarów życia osobnika, np. zachowania, motoryki lub odczuwania przyjemności.

Niezwykle istotna dla utrzymania stanu homeostazy organizmu jest właściwa ekspresja genów dla COXs oraz kontrola ich optymalnego poziomu translacji, a także aktywności enzymatycznej białek. Zaburzenia mechanizmów regulujących aktywność COX-1 i 2 mogą prowadzić do wystąpienia chorób zlokalizowanych zarówno na obwodzie, jak i w OUN (MINGHETTI 2004, HUSBAND i MEHTA 2013). Wzmocniona ekspresja COX-2 obserwowana jest podczas wielu schorzeń obwodowych, wśród których wyróżnia się np. zaburzenia naczyniowe (zakrzepicę miażdżycową) lub schorzenia stawów (artretyzm) (CIPOLLONE i FAZIA 2006, KIM i współaut. 2016). W obrębie OUN wyższy poziom COX-2 związany jest z występowaniem schorzeń neurodegeneracyjnych takich jak: stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera lub Parkinsona. W celu zwalczania objawów wymienionych chorób stosowane są związki z szerokiej grupy inhibitorów cyklooksigenaz, przy czym skuteczniejsze są specyficzne inhibitory COX-2, hamujące aktywność indukowanej formy COX. Niestety wciąż wiele osób w sposób niekontrolowany korzysta z przeciwbólowych i przeciwzapalnych właściwości nioselektywnych inhibitorów COX, hamujących nie tylko aktywność formy indukowanej, ale i konstytutywnej (TEISMANN i współaut. 2003, MAINGRET i współaut. 2017, PALUMBO 2017). Związki te skutecznie niwelują stany zapalne i związane z nimi ból, lecz oddziałują również negatywnie na homeostazę wielu narządów wewnętrznych. Co więcej, ich długotrwałe stosowanie, np. w przypadku przewlekłego bólu, może doprowadzić do wystąpienia objawów niepożądanych, tj. wrzodów żołądka, niewydolności nerek, a nawet chorób sercowo-naczyniowych (WALLACE 2000, FOKUNANG i współaut. 2018, SHAHRASBI i współaut. 2018). Z perspektywy komunikacji układu odpornościowego i OUN długotrwałe stosowanie inhibitorów COX jest niekorzystne, ponieważ PGE₂ wydzielana przez komórki układu odpornościowego pełni rolę ważnego mediatora stanu zapalnego. Indukuje ona szereg mechanizmów obronnych, takich jak gorączka i sickness behavior, które mają na celu unieszkodliwienie obecnych w organizmie patogenów. W sytuacji, gdy aktywność COX jest stale hamowana, układ odpornościowy nie może skutecznie przekazywać do OUN informacji o zagrożeniu i tym samym nie dochodzi do prawidłowej indukcji wspomnianych mechanizmów obronnych (Li i współaut. 2001, DE PAIVA i współaut. 2010). W konsekwencji może to prowadzić do progresji istniejących chorób w wyniku maskowania ich objawów.

Streszczenie

Wymiana informacji pomiędzy wzbudzonym układem odpornościowym a ośrodkowym układem nerwowym

(OUN) zapewnia utrzymanie stanu homeostazy organizmu. Jedną z głównych dróg odpowiedzialnych za wspomnianą komunikację jest droga humoralna. Reprezentują ją związki uwalniane przez komórki odpornościowe i uszkodzone tkanki. Częstoczkami istotnie zaangażowanymi we wspomniany proces komunikacji są prostaglandyny, szczególnie prostaglandyna E₂ (PGE₂), powstająca w wyniku aktywności cyklooksigenaz. PGE₂ penetruje wszelkie bariery organizmu, w tym barierę krew-mózg, a co więcej, w OUN potwierdzono obecność specyficznych dla niej receptorów. Za ich pośrednictwem PGE₂ moduluje aktywność układów neurotransmisyjnych w OUN, co w konsekwencji indukuje złożone mechanizmy odpornościowe. Ostatecznie dochodzi do skutecznej neutralizacji infekcji, przy jednoczesnym hamowaniu aktywności nadmiernie wzbudzonego układu odpornościowego. Efekty wywołane przez PGE₂ ulegają osłabieniu lub całkowitemu zniesieniu przez zastosowanie określonych inhibitorów cyklooksigenaz. Niniejsza praca stanowi podsumowanie obecnych wiadomości dotyczących procesów wymiany informacji pomiędzy wzbudzonym układem odpornościowym a OUN za pośrednictwem PGE₂.

LITERATURA

- ABBOTT F. V., FRASER M. I., 1998. *Use and abuse of over-the-counter analgesic agents*. J. Psychiatr. Neurosci. 23, 13-34.
- ABDULKHALEQ L. A., ASSI M. A., ABDULLAH R., ZAMRI-SAAD M., TAUFIQ-YAP Y. H., HEZMEE M. N. M., 2018. *The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review*. Vet. World 11, 627-635.
- AKANUMA S. I., UCHIDA Y., OHTSUKI S., TACHIKAWA M., TERASAKI T., HOSOYA K. I., 2011. *Attenuation of prostaglandin E 2 elimination across the mouse blood-brain barrier in lipopolysaccharide-induced inflammation and additive inhibitory effect of cefmetazole*. Fluids Barriers CNS 8, 1-12.
- ALEXANIAN A., SOROKIN A., 2017. *Cyclooxygenase 2: protein-protein interactions and posttranslational modifications*. Physiol. Genomics 49, 667-681.
- ANDREASSON K., 2010. *Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease*. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 91, 104-112.
- BANKS W. A., 2015. *The blood-brain barrier in neuroimmunology: tales of separation and assimilation*. Brain Behav. Immun. 44, 1-8.
- BIANCARDI V. C., STERN J. E., 2016. *Compromised blood-brain barrier permeability: novel mechanism by which circulating angiotensin II signals to sympathoexcitatory centres during hypertension*. J. Physiol. 594, 1591-1600.
- BLATTEIS C. M., 2007. *The onset of fever: new insights into its mechanism*. Progr. Brain Res. 162, 3-14.
- BLATTEIS C. M., LI S., LI Z., FELEDER C., PERLIK V., 2005. *Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment*. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 76, 1-18.
- BOTTING R. M., 2010. *Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology*. Pharmacol. Rep. 62, 518-525.
- BRITT JR R. D., LOCY M. L., TIPPLE T. E., NELIN L. D., ROGERS L. K., 2012. *Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse transformed Clara cells*. Cell. Physiol. Biochem. 29, 213-222.

- CARLSON N. G., ROJAS M. A., REDD J. W., TANG P., WOOD B., HILL K. E., ROSE J. W., 2010. *Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity to excitotoxic death*. *J. Neuroinflamm.* 7, 1-11.
- CALKOSIŃSKI I., DOBRZYŃSKI M., CALKOSIŃSKA M., SEWERYN E., BRONOWICKA-SZYDELKO A., DZIERZBA K., GAMIAN A., 2009. *Charakterystyka odczynu zapalnego*. *Post. Hig. Med. Dośw.* 63, 395-408.
- CARULLO G., GALLIGANO F., AIELLO F., 2017. *Structure-activity relationships for the synthesis of selective cyclooxygenase 2 inhibitors: an overview (2009-2016)*. *Med. Chem. Comm.* 8, 492-500.
- CHANDRASEKHARAN N. V., DAI H., ROOS K. L. T., EVANSON N. K., TOMSIK J., ELTON T. S., SIMMONS D. L., 2002. *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13926-13931.
- CIPOLLONE F., FAZIA M. L., 2006. *COX-2 and atherosclerosis*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47, 26-36.
- DANTZER R., 2009. *Cytokine, sickness behavior, and depression*. *Immun. Allergy Clin.* 29, 247-264.
- DANTZER R., KONSAMAN J. P., BLUTHÉ R. M., KELLEY K. W., 2000. *Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent?* *Autonom. Neurosci.* 85, 60-65.
- DE PAIVA V. N., LIMA S. N., FERNANDES M. M., SONCINI R., ANDRADE C. A., GIUSTI-PAIVA A., 2010. *Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice*. *Behav. Brain Res.* 215, 146-151.
- DINARELLO C. A., 1999. *Cytokines as endogenous pyrogens*. *J. Infect. Diseases* 179, 294-304.
- DINARELLO C. A., 2002. *The IL-1 family and inflammatory diseases*. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20, 1-13.
- DUNN A. J., 1988. *Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone*. *Life Sci.* 43, 429-435.
- DUNN A. J., 2006. *Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry*. *Clin. Neurosci. Res.* 6, 52-68.
- FITZGERALD G. A., 2003. *COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease*. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 879-890.
- FLAVELL S. W., GREENBERG M. E., 2008. *Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system*. *Ann. Rev. Neurosci.* 31, 563-590.
- FOKUNANG C. N., FOKUNANG E. T., FREDERICK K., NGAMENI B., NGADJUI B., 2018. *Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in resource limited countries*. *MedCrave Online J. Toxicol.* 4, 5-13.
- FUNK C. D., 2001. *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. *Science* 294, 1871-1875.
- GRÖSCH S., NIEDERBERGER E., GEISLINGER G., 2017. *Investigational drugs targeting the prostaglandin E2 signaling pathway for the treatment of inflammatory pain*. *Expert Opin. Investigat. Drugs* 26, 51-61.
- HANSSON E., 2010. *Long-term pain, neuroinflammation and glial activation*. *Scand. J. Pain* 1, 67-72.
- HERMAN J. P., MUELLER N. K., FIGUEIREDO H., 2004. *Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration*. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1018, 35-45.
- HARRIS R. C., 2000. *Cyclooxygenase-2 in the kidney*. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2387-2394.
- HOSHINO T., NAMBA T., TAKEHARA M., NAKAYA T., SUGIMOTO Y., ARAKI W., NARUMIYA S., SUZUKI T., MIZUSHIMA T., 2009. *Prostaglandin E2 stimulates the production of amyloid beta peptides through internalization of the EP4 receptor*. *J. Biol. Chem.* 284, 18493-18502.
- HUSBAND M., MEHTA V., 2013. *Cyclo-oxygenase-2 inhibitors*. *Continuing education in anaesthesia. Crit. Care Pain* 13, 131-135.
- IKEDA-MATSUO Y., MIYATA H., MIZOGUCHI T., OHAMA E., NAITO Y., UEMATSU S., AKIRA S., SASAKI Y., TANABE M., 2019. *Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor in dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease*. *Neurobiol. Disease* 124, 81-92.
- JOHANSSON J. U., WOODLING N. S., SHI J., ANDREASSON K. I., 2015. *Inflammatory cyclooxygenase activity and PGE2 signaling in models of Alzheimer's disease*. *Curr. Immunol. Rev.* 11, 125-131.
- KIM J., VAISH V., FENG M., FIELD K., CHATZISTAMOU I., SHIM M., 2016. *Transgenic expression of cyclooxygenase-2 (COX2) causes premature aging phenotypes in mice*. *Aging* 8, 2392-2405.
- KIS B., ISSE T., SNIPES J. A., CHEN L., YAMASHITA H., UETA Y., BUSJA D. W., 2006. *Effects of LPS stimulation on the expression of prostaglandin carriers in the cells of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers*. *J. Appl. Physiol.* 100, 1392-1399.
- KIECKER C., 2017. *The origins of the circumventricular organs*. *J. Anat.* 232, 540-553.
- KITAOKA S., FURUYASHIKI T., NISHI A., SHUTO T., KOYASU S., MATSUOKA T., MIYASAKA M., GREENGARD P., NARUMIYA S., 2007. *Prostaglandin E2 acts on EP1 receptor and amplifies both dopamine D1 and D2 receptor signaling in the striatum*. *J. Neurosci.* 27, 12900-12907.
- KOBRZYCKA A., RUDNICKI K., JABŁŃSKI G., WIECZOREK M., 2017. *Immunosensoryczne funkcje nerwu błędnego*. *Kosmos* 66, 651-663.
- KOBRZYCKA A., NAPORA P., PEARSON B. L., PIERZCHAŁA-KOZIEC K., SZEWczyk R., WIECZOREK M., 2019. *Peripheral and central compensatory mechanisms for impaired vagus nerve function during peripheral immune activation*. *J. Neuroinflamm.* 16, 1-18.
- KOEBERLE A., WERZ O., 2015. *Perspective of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders*. *Biochem. Pharmacol.* 98, 1-15.
- KOWALSKI M. L., MAKOWSKA J. S., BLANCA M., BAWBEK S., BOCHENEK G., BOUSQUET J., BOUSQUET P., CELIK G., DEMOLY P., GOMES E. R., NIŻANKOWSKA-MOGILNICKA E., ROMANO A., SANCHEZ-BORGES M., SANZ M., TORRES M. J., DE WECK A., SZCZEKLIK A., BROCKOW K., 2011. *Nadwrażliwość na niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)-klasyfikacja, rozpoznawanie i leczenie: przegląd EAACI/ENDA# i GA2LEN/HANNA*. *Alergia Astma Immunol.* 16, 57-68.
- LAZARUS M., 2006. *The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever*. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 451-455.
- LEVI G., MINGHETTI L., ALOISI F., 1998. *Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of prostaglandin E2 on microglial functions*. *Biochimie* 80, 899-904.
- LI S., BALLOU L. R., MORHAM S. G., BLATTEIS C. M., 2001. *Cyclooxygenase-2 mediates the fe-*

- brile response of mice to interleukin-1 β . *Brain Res.* 910, 163-173.
- LIN T. Y., LU C. W., WANG C. C., HUANG S., K., WANG S. J., 2014. Cyclooxygenase 2 inhibitor celecoxib inhibits glutamate release by attenuating the PGE₂/EP2 pathway in rat cerebral cortex endings. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 351, 134-145.
- LOYNES C. A., LEE J. A., ROBERTSON A. L., STEEL M. J., ELLETT F., FENG Y., LEVY B. D., WHYTE M. K. B., RENSHAW S. A., 2018. PGE₂ production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution *in vivo*. *Sci. Advances* 4, 1-13.
- MAINGRET V., BARTHET G., DEFORGES S., JIANG N., MULLE C., AMÉDÉE T., 2017. PGE₂-EP3 signaling pathway impairs hippocampal presynaptic long-term plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 50, 13-24.
- MARTY V., HACHMANE M., AMÉDÉE T., 2008. Dual modulation of synaptic transmission in the nucleus tractus solitarius by prostaglandin E2 synthesized downstream of IL-1 β . *Eur. J. Neurosci.* 27, 3132-3150.
- MASON B. L., PARIANTE C. M., JAMEL S., THOMAS S. A., 2010. Central nervous system (CNS) delivery of glucocorticoids is fine-tuned by saturable transporters at the blood-CNS barriers and nonbarrier regions. *Endocrinology* 151, 5294-5305.
- MEDEIROS A., PERES-BUZALAF C., FORTINO V. F., SEREZANI C. H., 2012. Prostaglandin E₂ and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. *Med. Inflamm.* 2012, 1-13.
- MINGHETTI L., 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 901-910.
- MINGHETTI L., LEVI G., 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanooids and nitric oxide. *Progr. Neurobiol.* 54, 99-125.
- MINGHETTI L., POCCHIARI M., 2007. Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2, and microglial activation in prion diseases. *Int. Rev. Neurobiol.* 82, 265-275.
- MINGHETTI L., POLAZZI E., NICOLINI A., CRÉMINON C., LEVI G., 1997. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in cultured microglia by prostaglandin E2, cyclic AMP and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Neurosci.* 9, 934-940.
- MINGHETTI L., NICOLINI A., POLAZZI E., GRECO A., PERRETTI M., PARENTE L., LEVI G., 1999. Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. *Brit. J. Pharmacol.* 126, 1307-1314.
- NAKANISHI T., TAMAI I., 2017. Roles of organic anion transporting polypeptide 2A1 (OATP2A1/SLCO2A1) in regulating the pathophysiological actions of prostaglandins. *AAPS J.* 20, 1-14.
- NAM K. W., JE K. H., LEE J. H., HAN H. J., LEE H. J., KANG S. K., MAR W., 2003. Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. *Arch. Pharm. Res.* 26, 383-388.
- OKA T., OKA K., SAPER C. B., 2003. Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. *Brain Res.* 968, 256-262.
- OOTSUKA Y., BLESSING W. W., STEINER A. A., ROMANOVSKY A. A., 2008. Fever response to intravenous prostaglandin E2 is mediated by the brain but does not require afferent vagal signaling. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, 1294-1303.
- PALUMBO S., 2017. Pathogenesis and progression of multiple sclerosis: The role of arachidonic acid-mediated neuroinflammation. [W:] *Multiple Sclerosis, Perspectives in Treatment and Pathogenesis*. ZAGON I. S., MCLAUGHLIN P. J. (red.). Codon Publications Brisbane, 111-124.
- PARENTE L., PERRETTI M., 2003. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem. Pharmacol.* 65, 153-159.
- PARK J. Y., PILLINGER M. H., ABRAMSON S. B., 2006. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* 119, 229-240.
- PECCHI E., DALLAPORTA M., JEAN A., THIRION S., TROADEC J. D., 2009. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiol. Behav.* 97, 279-292.
- PERRONE G. M., SCILIMATI A., SIMONE L., VITALE P., 2010. Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Curr. Med. Chem.* 17, 3769-3805.
- RAJAGOPALAN G., TILAHUN A. Y., ASMANN Y. W., DAVID C. S., 2009. Early gene expression changes induced by the bacterial superantigen, staphylococcal enterotoxin B and its modulation by a proteasome inhibitor. *Physiol. Genomics* 37, 279-293.
- REARDON C., MURRAY K., LOMAX A. E., 2018. Neuroimmune communication in health and disease. *Physiol. Rev.* 98, 2287-2316.
- REN L., YI J., YANG J., LI P., CHENG X., MAO P., 2018. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs use and risk of Parkinson disease: A dose-response meta-analysis. *Medicine* 97, 1-8.
- REGUŁA J., WOCIAL T., KRASZEWSKA E., BUTRUK, E., 2011. Stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w Polsce - badanie ankietowe u 38 tysięcy chorych. *Gastroenterol. Klin. Post. Stand.* 3, 72-78.
- RICCIOTTI E., FITZGERALD G. A., 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 986-1000.
- RIMON G., SIDHU R. S., LAUVER D. A., LEE J. Y., SHARMA N. P., YUAN C., FRIELER R. A., TRIVEL R. C., LUCCHESI B. R., SMITH W. L., 2010. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 28-33.
- RIVEST S., 2010. Interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Progr. Brain Res.* 181, 43-53.
- ROUZER C. A., MARNETT L. J., 2009. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res.* 50, 29-34.
- SAMBORSKI W., NIKLAS A., FILIPIAK K. J., KACZMARCZYK J., DOBROWOLSKA-ZACHWIEJA A., TYKARSKI A., 2017. Niesteroidowe leki przeciwzapalne a powikłania sercowo-naczyniowe i gastroenterologiczne - algorytm wyboru. *Choroby Serca i Naczyń* 14, 238-247.
- SANDER W. J., O'NEILL H. G., POHL C. H., 2017. Prostaglandin E2 as a modulator of viral infections. *Front. Physiol.* 8, 1-17.
- SAPER C. B., ROMANOVSKY A. A., SCAMMELL T. E., 2012. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat. Neurosci.* 15, 1-20.
- SCHLACHETZKI J. C., FIEBICH B. L., HAAKE E., DE OLIVEIRA A. C., CANDELARIO-JALIL E., HENEKA M. T., HÜLL M., 2010. Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and

- secretion of PGE 2 in primary rat microglia. *J. Neuroinflamm.* 7, 1-10.
- SEO M. J., OH D. K., 2017. Prostaglandin synthases: molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Progr. Lipid Res.* 66, 50-68.
- SHAHRASBI M., MOVAHED M. A., DADRAS O. G., DARAEI B., ZARGHI A., 2018. Design, synthesis and biological evaluation of new Imidazo (2, 1-B) thiazole derivatives as selective COX-2 inhibitors. *Iranian J. Pharmaceut. Res.* 17, 87-92.
- SHINPO K., HIRAI Y., MAEZAWA H., TOTSUKA Y., FUNAHASHI M. 2012. The role of area postrema neurons expressing H-channels in the induction mechanism of nausea and vomiting. *Physiol. Behav.* 1071, 98-103.
- ST-JACQUES B., MA W., 2014. Peripheral prostaglandin E2 prolongs the sensitization of nociceptive dorsal root ganglion neurons possibly by facilitating the synthesis and anterograde axonal trafficking of EP4 receptors. *Exp. Neurol.* 261, 354-366.
- SKOWRON-CENDRZAK A., 1993. Integralność układów nerwowego i odpornościowego. *Kosmos.* 42, 285-307.
- SOSZYŃSKI D., 2004. Sickness behavior - mechanizmy powstania i znaczenie. *Post. Hig. Med. Dośw.* 58, 74-82.
- STENKEN J. A., POSCHENRIEDER A. J., 2015. Bioanalytical chemistry of cytokines - A review. *Anal. Chim. Acta* 853, 95-115.
- STRAUSS K. I., 2008. Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. *Brain Behav. Immun.* 22, 285-298.
- STRLE K., ZHOU J. H., SHEN W. H., BROUSSARD S. R., JOHNSON R. W., FREUND G. G., DANTZER R., KELLEY K. W., 2001. Interleukin-10 in the brain. *Crit. Rev. Immunol.* 21, 427-449.
- SUGIMOTO Y., NARUMIYA S., 2007. Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 11613-11617.
- TEISMANN P., TIEU K., CHOI D. K., WU D. C., NAINI A., HUNOT S., VILA M., JACKSON-LEWIS V., PRZEDBORSKI S., 2003. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 5473-5478.
- TRACEY K. J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 117, 289-296.
- TSUCHIYA H., OKA T., NAKAMURA K., ICHIKAWA A., SAPER C. B., SUGIMOTO Y., 2008. Prostaglandin E2 attenuates preoptic expression of GABA-A receptors via EP3 receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 11064-11071.
- UFNAL M., WOLYNCZYK-GMAJ D., 2011. The brain and cytokines-the mutual origin of depression, obesity and cardiovascular diseases? *Post. Hig. Med. Dośw.* 65, 228-235.
- WALLACE J. L., 2000. How do NSAIDs cause ulcer disease? *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 14, 147-160.
- WANG P., GUAN P. P., WANG T., YU X., GUO J. J., WANG Z. Y., 2014. Aggravation of Alzheimer's disease due to the COX-2-mediated reciprocal regulation of IL-1 β and A β between glial and neuron cells. *Aging Cell* 13, 605-615.
- WOODLING N. S., COLAS D., WANG Q., MINHAS P., PANCHAL M., LIANG X., MAHTRE A. D., BROWN H., KO N., ZAGOL-IKAPITTE I., VAN DER HART M., KHROYAN T. V., CHULUUN B., PRIYAM P, G., MILNE G. L., RASSOULPOUR A., BOUTAUD O., MANNING-BOĞ A. B., HELLER C., ANDREASSON K. I., 2016. Cyclooxygenase inhibition targets neurons to prevent early behavioural decline in Alzheimer's disease model mice. *Brain* 139, 2063-2081.
- WOROŃ J., WORDLICZEK J., DOBROGOWSKI J., 2011. Porównanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). *Medycyna po Dyplomie* 6, 55-63.
- WRIGHT J. M., 2002. The double-edged sword of COX-2 selective NSAIDs. *Canad. Med. Assoc. J.* 167, 1131-1137.
- WU Z., NAKANISHI H., 2011. Phosphatidylserine-containing liposomes: potential pharmacological interventions against inflammatory and immune diseases through the production of prostaglandin E 2 after uptake by myeloid derived phagocytes. *Arch. Immunol. Therap. Exp.* 59, 195-201.
- VARDEH D., WANG D., COSTIGAN M., LAZARUS M., SAPER C. B., WOOLF C. J., FITZGERALD G. A., SAMAD T. A., 2009. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 287-294.
- YANG H., CHEN C., 2008. Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Curr. Pharmaceut. Design* 14, 1443-1451.
- ZHANG Y. H., LU J., ELMQUIST J. K., SAPER C. B., 2003. Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain. *J. Compar. Neurol.* 463, 3-12.
- ZHU P., GENC A., ZHANG X., ZHANG J., BAZAN N. G., CHEN C., 2005. Heterogeneous expression and regulation of hippocampal prostaglandin E2 receptors. *J. Neurosci. Res.* 81, 817-826.

KOSMOS Vol. 69, 2, 287–300, 2020

PAWEŁ NAPORA, ANNA KOBRZYCKA, MAREK WIECZOREK

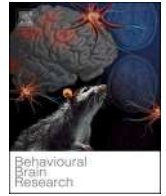
Department of Neurobiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, 141/143 Pomorska Str., 90-236 Łódź, E-mail: pawel.napora@unilodz.eu, marek.wieczorek@biol.uni.lodz.pl

PROSTAGLANDIN E2 AS A COMMUNICATION MOLECULE BETWEEN NERVOUS AND IMMUNE SYSTEM

Summary

The exchange of information between an excited immune system and the central nervous system (CNS) ensures that the homeostasis of the body is maintained. One of the main paths responsible for this communication is the humoral one. It is represented by compounds released by immune cells and damaged tissues. The molecules significantly involved in the aforementioned communication process are prostaglandins, especially prostaglandin E2 (PGE₂), resulting from the activity of cyclooxygenases. PGE₂ penetrates all body barriers, including the blood-brain barrier, and what is more, CNS-specific receptors have been confirmed in the CNS. Through them, PGE₂ modulates the activity of neurotransmission systems in the CNS, which consequently induces the body's complex immune mechanisms. Ultimately, the infection is effectively neutralized while inhibiting the activity of the over-excited immune system. The effects caused by PGE₂ are weakened or completely eliminated by the use of certain cyclooxygenase inhibitors. This work is a summary of current information on information exchange processes between an induced immune system and the CNS *via* PGE₂.

Key words: cyclooxygenases, immune system, nervous system, neuroimmunomodulation, prostaglandin E2



Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain

Paweł Napora^{a,*}, Anna Kobrzycka^a, Krystyna Pierzchała-Koziec^b, Marek Wieczorek^{a,*}¹

^a Department of Neurobiology, University of Łódź, Faculty of Biology and Environmental Protection, 141/143 Pomorska Street, 90-236 Łódź, Poland

^b Department of Animal Physiology and Endocrinology, University of Agriculture in Kraków, Al. Adama Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Cyclooxygenase
Prostaglandin E2
Chromatography
Monoamine
Behaviour

ABSTRACT

The long-term effects of cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1/2) inhibitors are usually tested in terms of the periphery of the organism. Therefore, we studied the effects of SC560 (selective COX-1 inhibitor) and celecoxib (selective COX-2 inhibitor) on the activity of brain monoaminergic systems and animal behaviour. Additionally, we tested the effect of these inhibitors during inflammation. We have observed that long-term administration of celecoxib reduces the activity of the noradrenergic system, increases the activity of dopaminergic and serotonergic systems, increases locomotor activity, and enhances the exploratory behaviour of rats. Administration of SC560 also increases the activity of dopaminergic and serotonergic systems but reduces locomotor activity and impairs the exploratory behaviour of rats. The mechanism responsible for decreased activity of the noradrenergic system may be related to the weakening of activity of the positive feedback loop between the paraventricular nucleus and coeruleus locus. We suggest that the effect of used inhibitors on the dopaminergic system is associated with a possible increase in anandamide concentration and its effect on dopamine reuptake in synaptic clefts. It also appears that cyclooxygenase peroxidase activity may play a role in this process. In turn, changes in the activity of the serotonergic system may be related to the activity of indoleamine-2,3-dioxygenase, which decreases because of the decreased concentration of pro-inflammatory compounds. We believe that behavioural changes induced by COX inhibitors are the result of the modified activity of monoaminergic CNS systems in the brainstem, hypothalamus, and medial prefrontal cortex.

1. Introduction

Enzymatic activity of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) – enzymes involved in prostaglandin E2 (PGE2) synthesis, is an extremely important factor regulating many processes related to maintaining the homeostasis of the organism. Many studies confirming the homeostatic functions of cyclooxygenases in the gastrointestinal tract, cardiovascular system, kidneys, and even central nervous system (CNS). In the

gastrointestinal tract, it is responsible for the blood flow through the mucous membranes and the secretion of protective substances, e.g., mucus and bicarbonates [35,19]. In the cardiovascular system prostacyclin (PGI) - another product of cyclooxygenase's activity plays the most important role. It is involved in many physiological processes, including vascular smooth muscle proliferation, inhibition of platelet aggregation, and leukocyte adhesion [19]. Also in the kidneys, both forms of COX play important role in their functioning. PGE2 produced

Abbreviations: COX-1, cyclooxygenase 1; COX-2, cyclooxygenase 2; PGE2, prostaglandin E2; CNS, central nervous system; PGI, prostacyclin; HPA, hypothalamic–pituitary–adrenal; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; CNT, control group; CEL, 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide, celecoxib, selective COX-2 inhibitor; SC560, 5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazole, SC-560, selective COX-1 inhibitor; s.c, subcutaneous injection; i.p., intraperitoneal injection; LPS, lipopolysaccharide (*Escherichia coli* 026:B6); BS, brainstem; HPT, hypothalamus; HI, hippocampus; PFM, medial prefrontal cortex; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EPM, elevated plus-maze; IL-6, interleukin 6; RP-HPLC-ED, reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection; NE, noradrenaline; DA, dopamine; 5-HT, serotonin; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA, Homovanillic acid; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; MANOVA, the multivariate analysis of variance test; PVN, paraventricular nucleus; CRF, corticotropin-releasing factor; LC, locus coeruleus; IDO, indoleamine-2,3-dioxygenase; SERT, serotonin transporters; MUPS, major urinary proteins.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: pawel.napora@edu.uni.lodz.pl (P. Napora), marek.wieczorek@biol.uni.lodz.pl (M. Wieczorek).

¹ ORCID: 0000-0002-0862-8076

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114143>

Received 18 July 2022; Received in revised form 26 September 2022; Accepted 30 September 2022

Available online 4 October 2022

0166-4328/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

by COX-1 is involved in the regulation of renin secretion and modulation of glomerular hemodynamics, while PGE2 produced by COX-2 is mainly responsible for regulating the excretion of sodium and water [19]. Both forms of COX have been also repeatedly shown to be found within the CNS. The presence of COX-1 was confirmed in microglia and perivascular cells, while COX-2 is present in postsynaptic dendrites and excitatory synaptic endings. Interestingly, COX-2 may affect neurotransmission systems through cannabinoid oxygenation and regulation of excitatory synaptic transmission [17,2,19].

Besides its homeostatic function, PGE2 is one of the crucial mediators of inflammatory response – a series of coordinated processes involving extra- and intracellular metabolic pathways, which in consequence provide to synthesis or response to pro- or anti-inflammatory mediators [67,51]. It is well known that PGE2 molecule, apart from its regulating effect on circulating immune cells [31], is also involved in transmitting information about inflammation and tissue damage from periphery of the body to CNS [51]. This statement is confirmed by the specific involvement of peripheral PGE2 molecule in induction of a CNS controlled fever response [57,15] and ability of PGE2 to activate the anti-inflammatory hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) [64,38].

Unfortunately, hyperactivity of cyclooxygenases may lead to the disturbance of the organism homeostasis associated with the development of specific diseases: rheumatoid arthritis [40], tumors, e. g. colon and prostate cancer [7] or chronic obstructive pulmonary disease [14]. [58] suggest that diseases caused by excessive COX-2 activity do not only concern the periphery of the body but may be related to the functioning of the CNS and inflammation within it. Therefore, disorders such as depression (also bipolar depression), schizophrenia and obsessive-compulsive disorder syndrome may develop. Additionally, COX-2 hyperactivity plays an important role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple sclerosis [58]. Particularly noteworthy is the fact that, according to some researchers, inhibition of COX-2 or its genetic deletion does not inhibit CNS inflammation. In contrast, CNS inflammation is suppressed when COX-1 activity is inhibited or it is genetically removed [3,13]. These reports suggest a different role of cyclooxygenases and their products within the CNS.

One of the main and most available methods for the reduction of inflammatory response strength is the blockade of PGE2 synthesis. For a long time, people have used substances aimed at reducing the activity of cyclooxygenases. Initially, substances of plant origin were used, including coumarins, alkaloids, flavonoids, cinnamates, stilbenes, and xanthines [11]. Then, with the development of technology and pharmaceutical sciences, safer and more selective cyclooxygenase inhibitors appeared – non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [4]. However, using of COXs inhibitors is not cost-free because of the side effects of NSAIDs [63]. Many authors have already described disturbances caused by inhibition of cyclooxygenase activity in the internal organs [35,19]. In the case of the gastrointestinal tract, long-term treatment with classic, non-selective COX inhibitors may lead to bleeding, perforation, and ulceration which is especially related to the inhibition of COX-1. In parallel, the inhibited activity of COX-2 affects the proliferation of the epithelium and the adhesion of leukocytes to it [35,19]. Long-term use of cyclooxygenase inhibitors causes an increase in blood pressure in both; people with hypertension and healthy ones [50]. Chronic inhibition of cyclooxygenases leads to a disturbance of the above-mentioned kidney functions, and even to the development of diseases, e.g., acute renal failure, especially in elderly age [61,34,23]. Currently, we can observe a global “epidemic” of poorly controlled overusing of NSAIDs, i.e., selective, and non-selective cyclooxygenase inhibitors, which applies to both; developed and developing countries [68,42]. Abuse of NSAIDs is related to their effectiveness in eliminating unpleasant inflammation symptoms, easy availability, and poor knowledge about side effects. This is an obvious problem mainly because of the peripheral side effects of NSAIDs [63]. As we presented here, peripheral side effects of long-term use of NSAIDs are well established.

Regarding CNS literature data poorly describes such side effects. COX inhibitors are known to affect the activity of some monoaminergic systems (e.g., dopaminergic, serotonergic) in the striatum [43] and may alleviate depression-like conditions in rats [27]. On the other hand, their long-term influence on sickness behaviour and activity of monoaminergic systems in other structures of the rat limbic system has not been thoroughly investigated. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of NSAIDs on animal behavior and the monoaminergic neurotransmission systems of the CNS. Due to the poor literature data, we decided to focus on the influence of NSAIDs on the areas of the brain involved in generating emotions and sickness behavior.

2. Results

2.1. Results of plasma measurement

The results of intergroup comparisons using the U Mann-Whitney test (with Bonferroni's correction) for the plasma results are presented in Supplementary Table 1. A graphical representation of the IL-6 and corticosterone concentration for the studied groups is shown in Fig. 8.

2.1.1. Analysis of IL-6 concentration in rats plasma

Essential changes in plasma IL-6 levels have been observed. Intraperitoneal injection of LPS caused a significant increase in IL-6 levels in control animals independently of long-term use of COX inhibitors and with their use (CNT+NaCl vs CNT+LPS: $U=0$, $p = 0.002$, CEL+NaCl vs CEL+LPS: $U=4$, $p = 0.001$, and SC560 +NaCl vs SC560 +LPS: $U=0$, $p < 0.001$). Such results confirm the development of inflammatory response in all tested groups after single LPS administration.

2.1.2. Analysis of corticosterone concentration in rats plasma

During the statistical analysis of the corticosterone concentration, we did not observe the significant impact of LPS injection on the value of the examined variable (CNT+NaCl vs CNT+LPS: $U=3$, $p = 0.067$). In addition, the effect of long-term injections of both COX inhibitors on the value of corticosterone concentration was not observed (CNT+NaCl vs CEL+NaCl: $U=25$, $p = 0.798$, CNT+NaCl vs SC560 + NaCl: $U=4$, $p = 0.629$). A statistically significant increase in plasma corticosterone level in response to a single LPS injection was noticed only in the group receiving long-term celecoxib injections (CEL+NaCl vs CEL+LPS: $U=26$, $p = 0.001$, SC560 +NaCl vs SC560 +LPS: $U=9$, $p = 0.130$).

2.2. Behavioural analysis results

The results of the intergroup comparisons for animal behaviour performed with the MANOVA test are presented in supplementary Table 2. Graphically presented comparisons of selected animal behaviour variables are shown in Fig. 10.

2.2.1. Locomotor activity

MANOVA test has shown that natural sickness behaviour – an LPS-induced decrease in locomotor activity was observed (INJECTION EFFECT): distance moved ($df=1$, $F=7.328$, $p = 0.008$, NaCl vs LPS $p = 0.004$), velocity ($df=1$, $F=7.331$, $p = 0.008$, NaCl vs LPS $p = 0.04$), moving ($df=1$, $F=7.720$, $p = 0.007$, NaCl vs LPS $p = 0.03$). Animals that chronically received celecoxib exhibited higher locomotor activity than other groups while in the SC560 group such effect was absent (GROUP EFFECT): distance moved ($df=2$, $F=16.567$, $p < 0.001$, CNT vs CEL $p = 0.01$; CNT vs SC560 $p = 0.263$; SC560 vs CEL $p < 0.001$), velocity ($df=2$, $F=16.568$, $p < 0.001$, CNT vs CEL $p = 0.01$; CNT vs SC560 $p = 0.263$; SC560 vs CEL $p < 0.001$), and moving ($df=2$, $F=10.923$, $p < 0.001$, CNT vs CEL $p = 0.060$; CNT vs SC560 $p = 0.419$; SC560 vs CEL $p < 0.001$). However, lack of cross effect (GROUP*INJECTION EFFECT) confirms that long-term administration of COX inhibitors did not affect locomotor activity changes during inflammation episode;

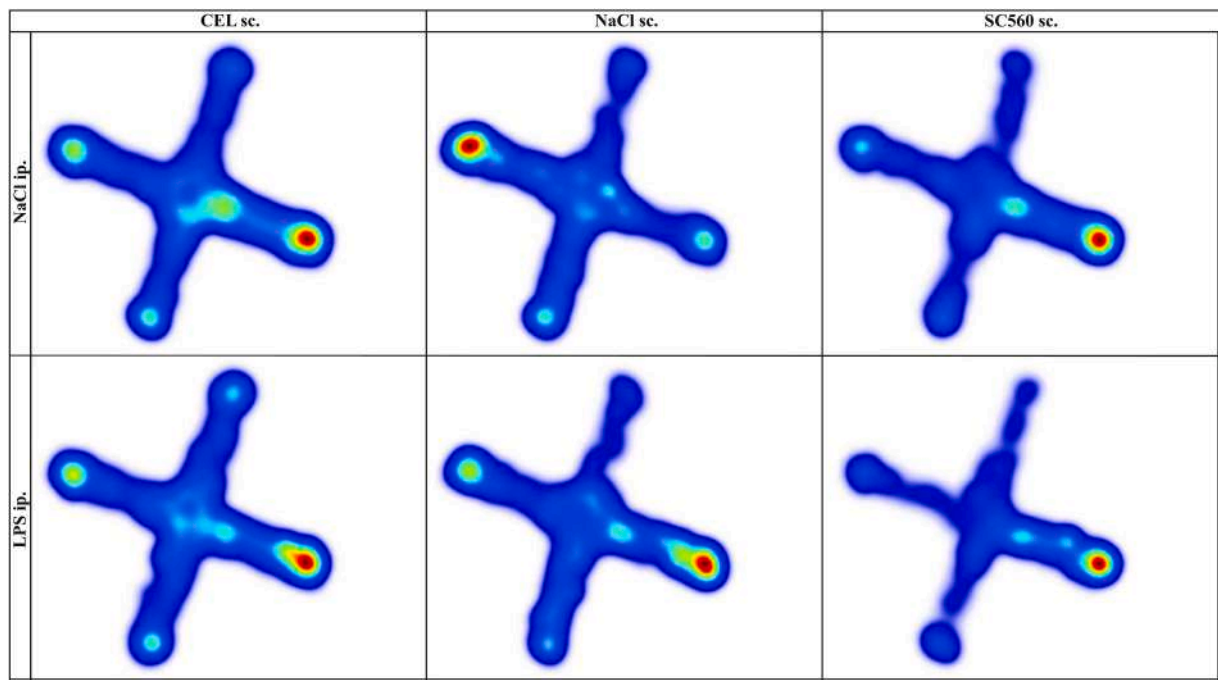


Fig. 1. Heat map. The dark red color shows the place where animals spend the most time. NaCl ip. (intraperitoneal injection of 0.9% NaCl solution), LPS ip. (intraperitoneal injection of lipopolysaccharide), CEL sc. (subcutaneous injection of celecoxib), NaCl sc. (subcutaneous injection of 0.9% NaCl solution), SC560 sc. (subcutaneous injection of SC560).

distance moved ($df=2$, $F=0.534$, $p = 0.588$, CNT+NaCl vs CEL+NaCl p-; CNT+LPS vs CEL+LPS p-; CEL+NaCl vs CEL+LPS p-; CNT+LPS vs SC560 +LPS p-; SC560 +LPS vs CEL+LPS p-; SC560 +NaCl vs SC560 +LPS p-; CEL+NaCl vs SC560 +NaCl p-; CEL+LPS vs SC560 +LPS p-), velocity ($df=2$, $F=0.534$, $p = 0.588$, same group comparisons), and moving ($df=2$, $F=1.707$, $p = 0.189$, same group comparisons).

2.2.2. Anxiety and risk assessment

The MANOVA test did not show a significant effect of experimental inflammation (INJECTION EFFECT) on the values of variables that define anxiety and risk assessment: in open arms [freq] ($df=1$, $F=2.091$, $p = 0.153$, NaCl vs LPS p-), in open arms [s] ($df=1$, $F=0.0086$, $p = 0.926$, NaCl vs LPS p-). During the analysis, we noticed a significant difference in GROUP EFFECTS. The mentioned difference was that animals receiving long-term celecoxib, but not SC560, were more likely to enter the open arms of the maze; in open arms [freq] ($df=2$, $F=11.215$, $p < 0.001$, CNT vs CEL $p = 0.031$; CNT vs SC560 $p = 0.633$; SC560 vs CEL $p < 0.001$), in open arms [s] ($df=2$, $F=2.514$, $p = 0.088$, CNT vs CEL p-; CNT vs SC560 p-; SC560 vs CEL p-). We did not observe a cross-effect (GROUP*INJECTION EFFECT) in animals receiving COX inhibitors during inflammation; in open arms [freq] ($df=2$, $F=0.314$, $p = 0.732$, CNT+NaCl vs CEL+NaCl p-; CNT+LPS vs CEL+LPS p-; CEL+NaCl vs CEL+LPS p-; CNT+LPS vs SC560 +LPS p-; SC560 +LPS vs CEL+LPS p-; SC560 +NaCl vs SC560 +LPS p-; CEL+NaCl vs SC560 +NaCl p-; CEL+LPS vs SC560 +LPS p-), in open arms [s] ($df=2$, $F=0.368$, $p = 0.694$, same group comparisons).

2.2.3. Heat map analysis

Observation of the heat maps generated by the EthoVision software (see Fig. 1) revealed the animal's preference to choose the right or left arm of the closed labyrinth. Based on the records obtained, we found that it is worth shedding more light on the frequency of entering the closed arms, time spent in them, and the delay associated with moving between both closed arms.

There was no effect of inflammation on the frequency of entering the

right and left closed arm (CNT+LPS, $T = 6.5$, $p = 0.205$). During the study of the effect of long-term administration of COX inhibitors, we also did not observe a significant effect on the value of the variable (CEL+NaCl: $T = 22.5$, $p = 0.060$, SC560 +NaCl: $T = 29.5$, $p = 0.149$). Only in the case of chronic administration of SC560 with the experimentally generated inflammation, we observed the influence of the cross-effect on the value of the parameter studied. In the remaining animals, we did not observe similar changes: (CEL+LPS: $T = 20.5$, $p = 0.147$, SC560 +LPS: $T = 0.0$, $p = 0.005$). We observed that animals with chronically inhibited COX-1 activity and exhibiting inflammation were more likely to choose the right closed arm of the maze.

Analysis of the time spent by animals in the maze showed no significant effect of inflammation on the preferences of the right or left closed arm (CNT+LPS: $T = 9.0$, $p = 0.208$). We observed an effect of SC560 but not celecoxib on the value of the studied variable (CEL+NaCl: $T = 27.0$, $p = 0.061$, SC560 +NaCl: $T = 16.0$, $p = 0.013$). Moreover, we found that administering SC-560 but not celecoxib along with experimentally induced inflammation also influenced the time spent in a specific part of the maze (CEL+NaCl: $T = 27.0$, $p = 0.109$, SC560 +LPS: $T = 11.5$, $p = 0.006$). Inflamed and COX-1 inhibited animals stayed longer in the closed right arm of the maze.

The analysis of latencies occurring before entering the selected arms of the maze did not show any influence of inflammation (CNT+LPS: $T = 14.0$, $p = 0.575$). All groups of animals receiving COX inhibitors, during and regardless of inflammation, showed significant latency before entering the left closed arm of the maze (CEL+NaCl: $T = 12.0$, $p = 0.011$, CEL+LPS: $T = 18.0$, $p = 0.017$, SC560 +NaCl: $T = 3.0$, $p = 0.003$, SC560 +LPS: $T = 0.0$, $p = 0.002$). Animal preferences for the right or left arm of the maze obtained in the Wilcoxon test for paired trials are shown in supplementary Table 3. A graphical representation of the results is shown in Fig. 9.

2.3. Neurochemical analysis of selected structures of the rat brain

2.3.1. MHPG/NE results

We did not observe any statistically significant influence of

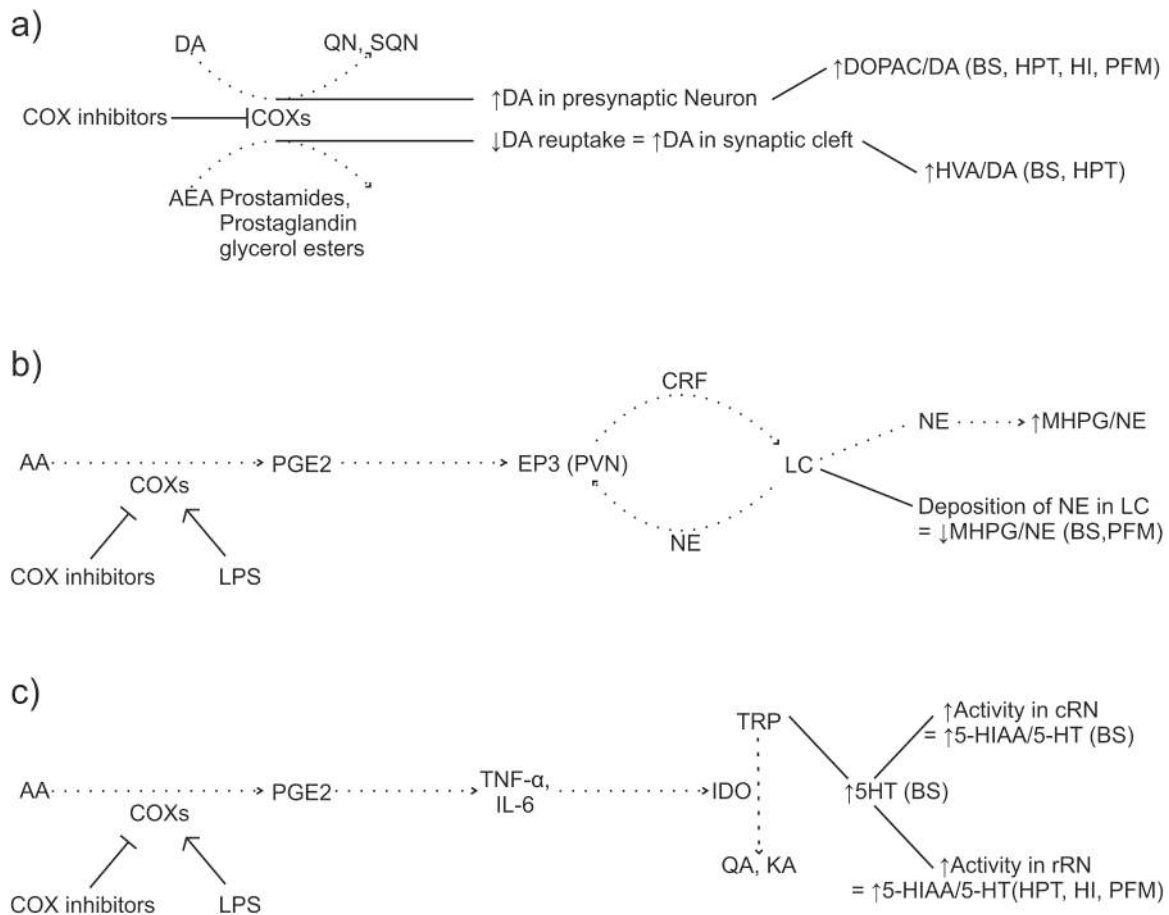
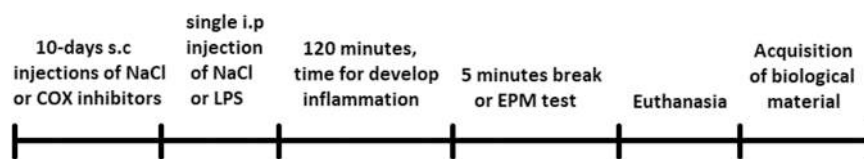


Fig. 2. Graphically presented mechanisms that may be responsible for the observed changes within selected monoaminergic CNS systems. LPS (lipopolysaccharide), COXs (cyclooxygenases), iCOXs (cyclooxygenases inhibitors), TNF- α (tumor necrotic factor α), IL-6 (interleukin 6), AA (anandamide), PGE2 (prostaglandin E2), EP3 (prostaglandin E receptor 3), PVN (paraventricular nucleus), CRF (corticotropin-releasing factor), NE (noradrenaline), MHPG (3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol), DA (dopamine), DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid), HVA (homovanillic acid), 5-HT (serotonin), 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid), LC (locus coeruleus), BS (brainstem), HPT (hypothalamus), HI (hippocampus), PFM (medial prefrontal cortex), MHPG/NE (noradrenaline metabolism), DOPAC/DA (intracellular dopamine metabolism), HVA/DA (extracellular dopamine metabolism), 5HIAA/5HT (serotonin metabolism), QA (quinolinic acid), KA (kynurenic acid), \uparrow (increase).



peripheral inflammation on the MHPG/NE ratio in any of the tested brain area (CNT+NaCl vs CNT+LPS: BS $U=19$, $p=0.388$, HPT $t=-0.072$, $p=0.944$, HI $U=6$, $p=0.126$, PFM $U=5$, $p=0.041$). Long-term administration of both COX inhibitors did not affect MHPG/NE ratio in all brain regions of non-inflammatory animals (CNT+NaCl vs CEL+NaCl: BS $U=14$, $p=0.019$, HPT $t=-0.638$, $p=0.532$, HI $U=19$, $p=0.388$, PFM $U=7$, $p=0.018$, CNT+NaCl vs SC560 +NaCl: BS $U=21$, $p=0.299$, HPT $t=-0.972$, $p=0.366$, HI $U=17$, $p=0.180$, PFM $U=19$, $p=0.573$). On the other hand, we noticed that long-term administration of celecoxib (CEL) but not SC560 significantly decreased MHPG/NE ratio in BS and PFM during inflammation (CEL+LPS vs CNT+LPS: BS $U=2$, $p<0.001$, PFM $U=0$, $p<0.001$). We did not observe differences in MHPG/NE ratios between groups receiving one of the COX inhibitors without (CEL+NaCl vs SC560 +NaCl: BS $U=16$, $p=0.114$, HPT $t=-0.650$, $p=0.524$, HI $U=38$, $p=0.603$, PFM $U=25$, $p=0.321$) or with inflammation

(CEL+LPS vs SC560 +LPS: BS $U=14$, $p=0.021$, HPT $t=-0.491$, $p=0.629$, HI $U=33$, $p=0.356$, PFM $U=19$, $p=0.114$). The results of intergroup comparisons using the U Mann-Whitney test (with Bonferroni's correction) for the MHPG/NE ratio are presented in supplementary Table 4. Graphically presented values of the discussed variable are presented in Fig. 4.

2.3.2. DOPAC/DA results

It has been shown that the induction of experimental inflammation does not affect the value of the DOPAC/DA ratio in any of the analyzed brain structures (CNT+NaCl vs CNT+LPS: BS $U=14$, $p=0.145$, HPT $t=-1.139$, $p=0.283$, HI $U=2$, $p=0.018$, PFM $U=6$, $p=0.035$). We noticed that long-term administration of celecoxib significantly increased DOPAC/DA ratio in selected CNS structures of animals without (CEL+NaCl vs CNT+NaCl: BS $U=0$, $p<0.001$, HPT $U=3.684$, $p=0.003$, HI $U=2$, $p=0.002$, PFM $U=1$, $p=0.001$) and with

Noradrenaline metabolism

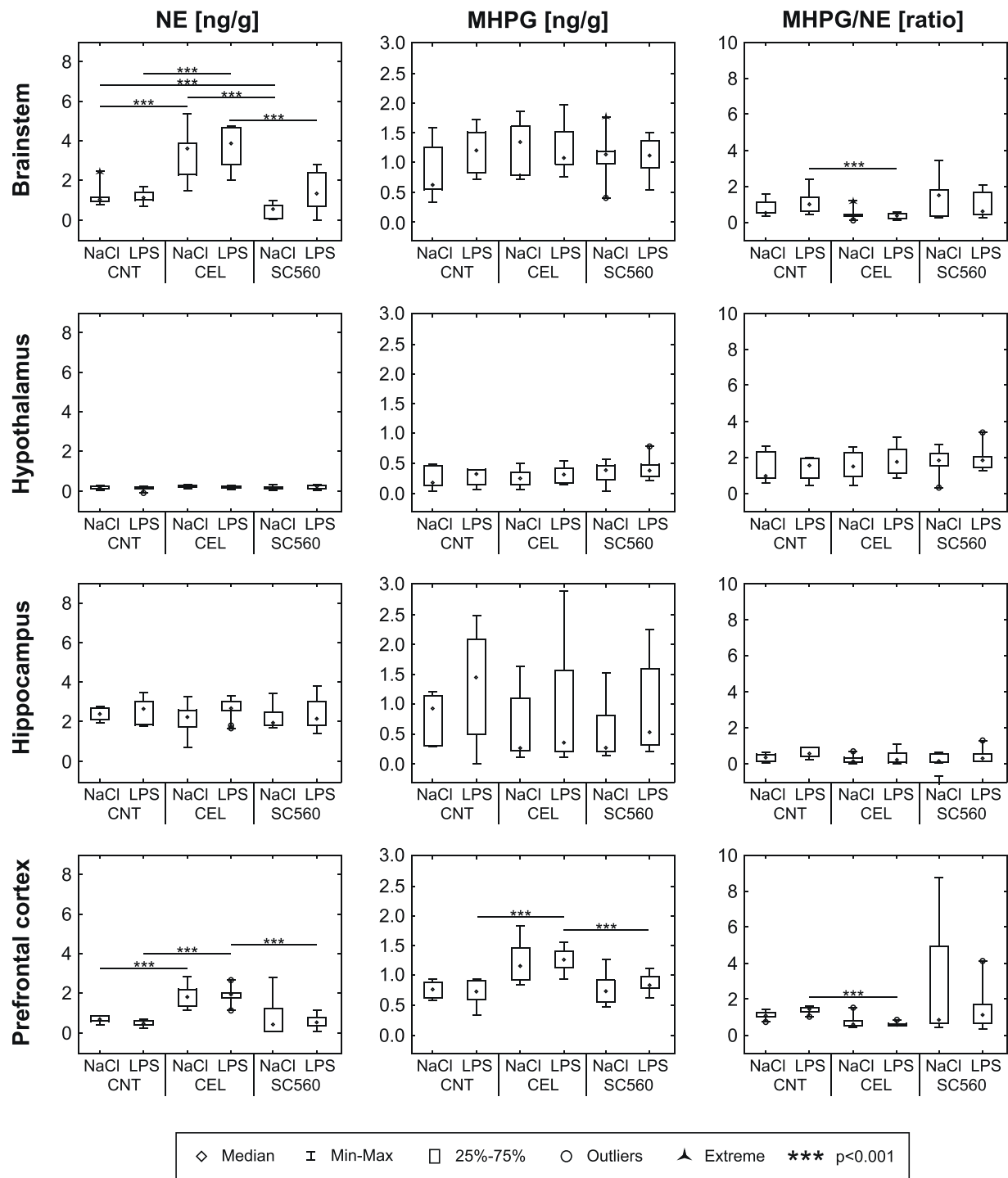


Fig. 4. The concentration of norepinephrine and its metabolite and the values of utilization ratios. NE – norepinephrine, MHPG – 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, MHPG/NE – MHPG to norepinephrine utilization index, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% NaCl solution, LPS – single intraperitoneal LPS injection, CNT – control group, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

inflammation (CEL+LPS vs CNT+LPS: PFM $U=1$, $p < 0.001$). We observed that long-term administration of SC560 also significantly increased DOPAC/DA ratio in studied CNS structures of animals without (SC560 +NaCl vs CNT+NaCl: BS $U=0$, $p = 0.001$, HPT $t = 3.314$,

$p = 0.002$, HI $U=4$, $p = 0.003$, PFM $U=3$, $p = 0.002$) and with inflammation (SC560 +LPS vs CNT+LPS: HPT $t = 3.262$, $p = 0.003$, PFM $U=6$, $p = 0.003$). Again, we did not observe differences in DOPAC/DA ratios between groups receiving one of the COX inhibitors without

Intracellular dopamine metabolism

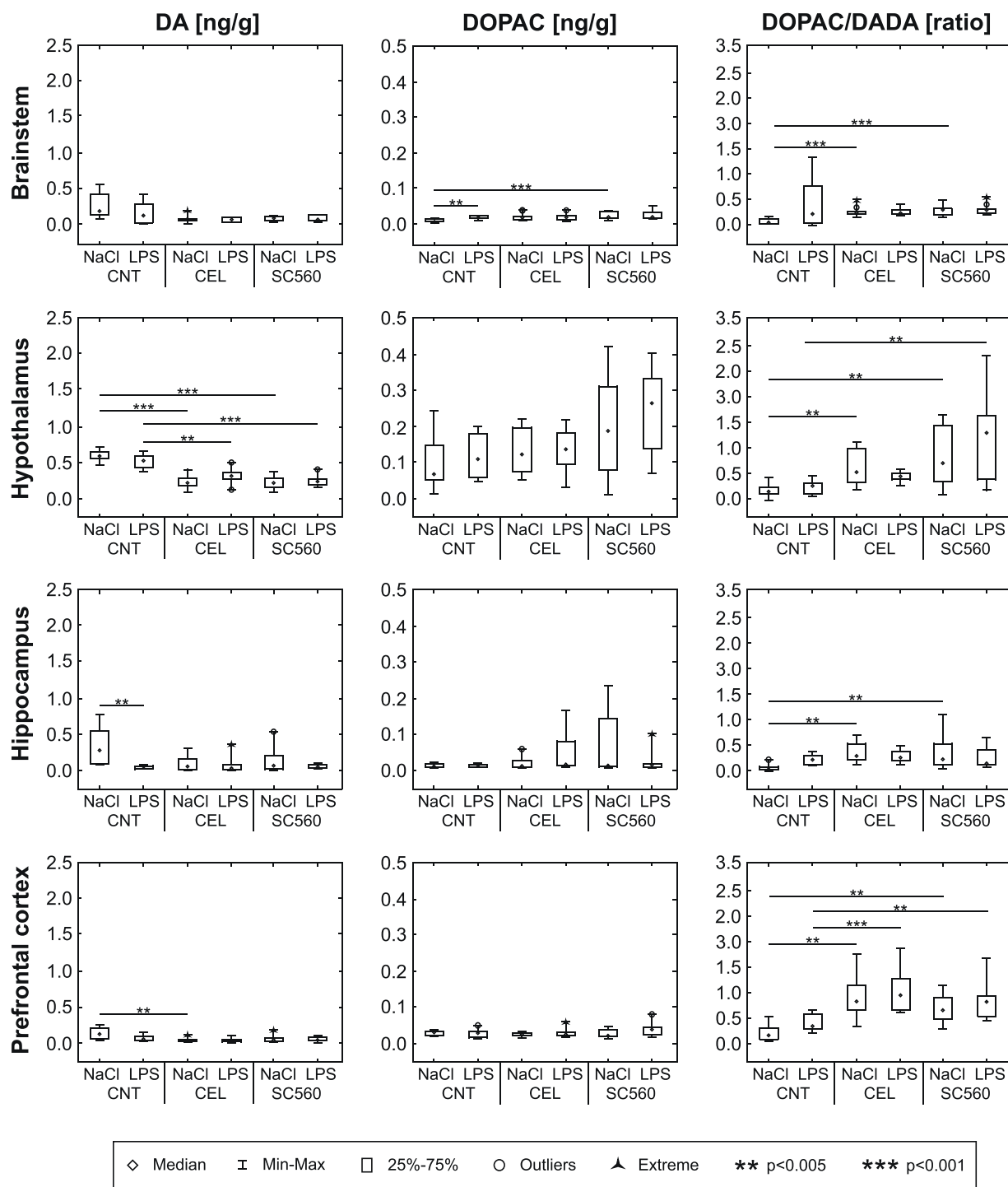


Fig. 5. The concentration of dopamine and its intracellular metabolite and the values of utilization ratios. DA – dopamine, DOPAC – 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC/DA – DOPAC to dopamine utilization index, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% NaCl solution, LPS – single intraperitoneal LPS injection, CNT – control group, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

(CEL+NaCl vs SC560 +NaCl: BS $U=32$, $p = 0.315$, HPT $t = -0.942$, $p = 0.361$, HI $U=33$, $p = 0.356$, PFM $U=29$, $p = 0.360$) or with inflammation (CEL+LPS vs SC560 +LPS: BS $U=49$, $p = 0.971$, HPT $t = -2.831$, $p = 0.025$, HI $U=21$, $p = 0.279$, PFM $U=30$, $p = 0.243$). The results of intergroup comparisons using the U Mann-Whitney test

(with Bonferroni’s correction) for the DOPAC/DA ratio are presented in supplementary Table 5. Graphically presented values of the discussed variable are presented in Fig. 5.

Extracellular dopamine metabolism

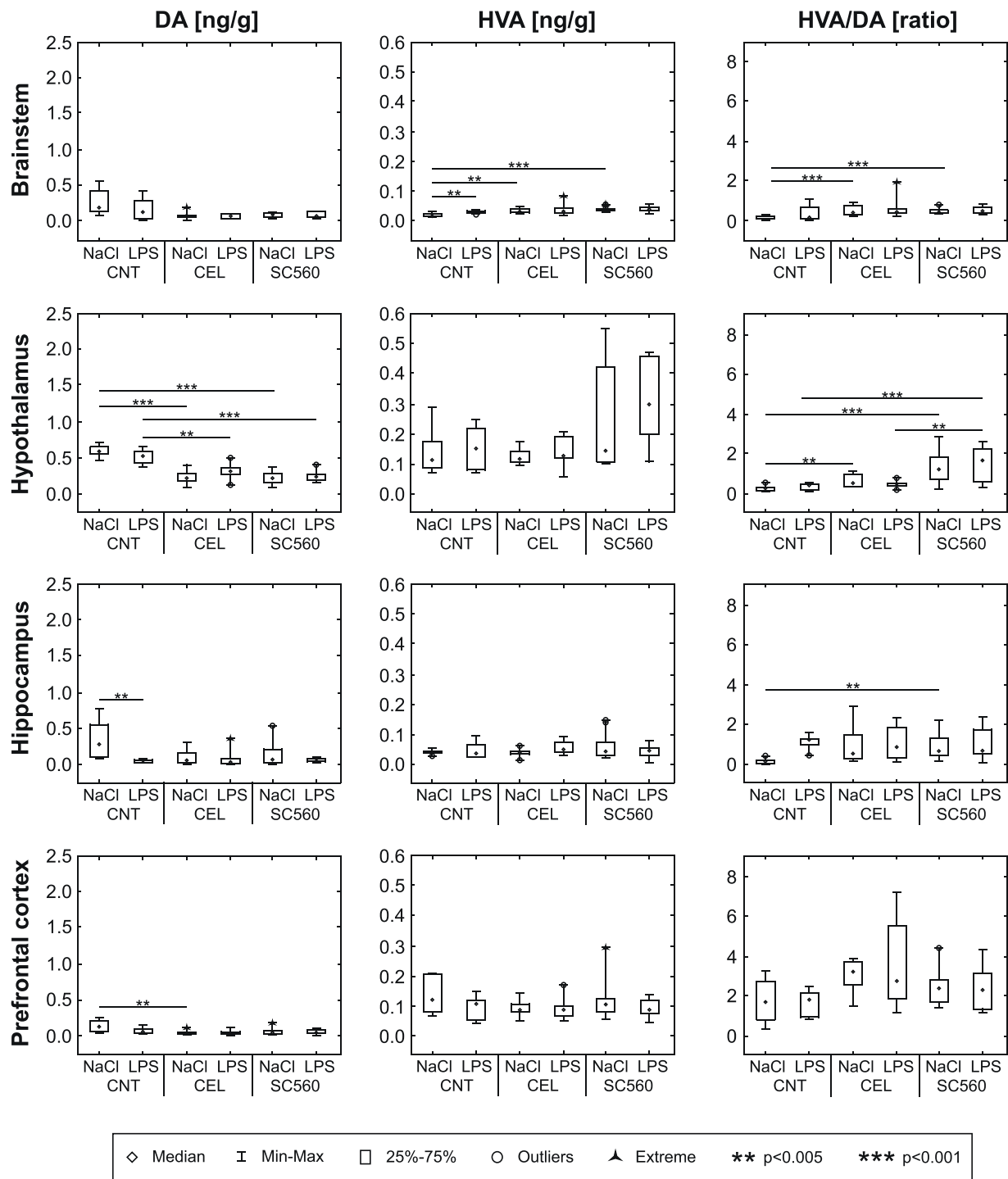


Fig. 6. The concentration of dopamine and its extracellular metabolite and the values of utilization ratios. DA – dopamine, HVA – homovanillic acid, HVA/DA – HVA to dopamine utilization index, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% NaCl solution, LPS – single intraperitoneal LPS injection, CNT – control group, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

2.3.3. HVA/DA results

The analysis showed that intraperitoneal administration of LPS does not affect the value of the HVA/DA ratio in any of the studied CNS structures (CNT+NaCl vs CNT+LPS: BS $U=12$, $p=0.190$, HPT $t=-0.944$, $p=0.367$, HI $U=0$, $p=0.008$, PFM $U=20$, $p=0.945$). We

noticed that long-term administration of celecoxib significantly increased HVA/DA ratio in BS and HPT of not-inflammatory animals (CEL+NaCl vs CNT+NaCl: BS $U=1$, $p<0.001$, HPT $t=3.489$, $p=0.003$). Animals with experimentally induced inflammation, which chronically received celecoxib, did not show changes in the value of the

Serotonin metabolism

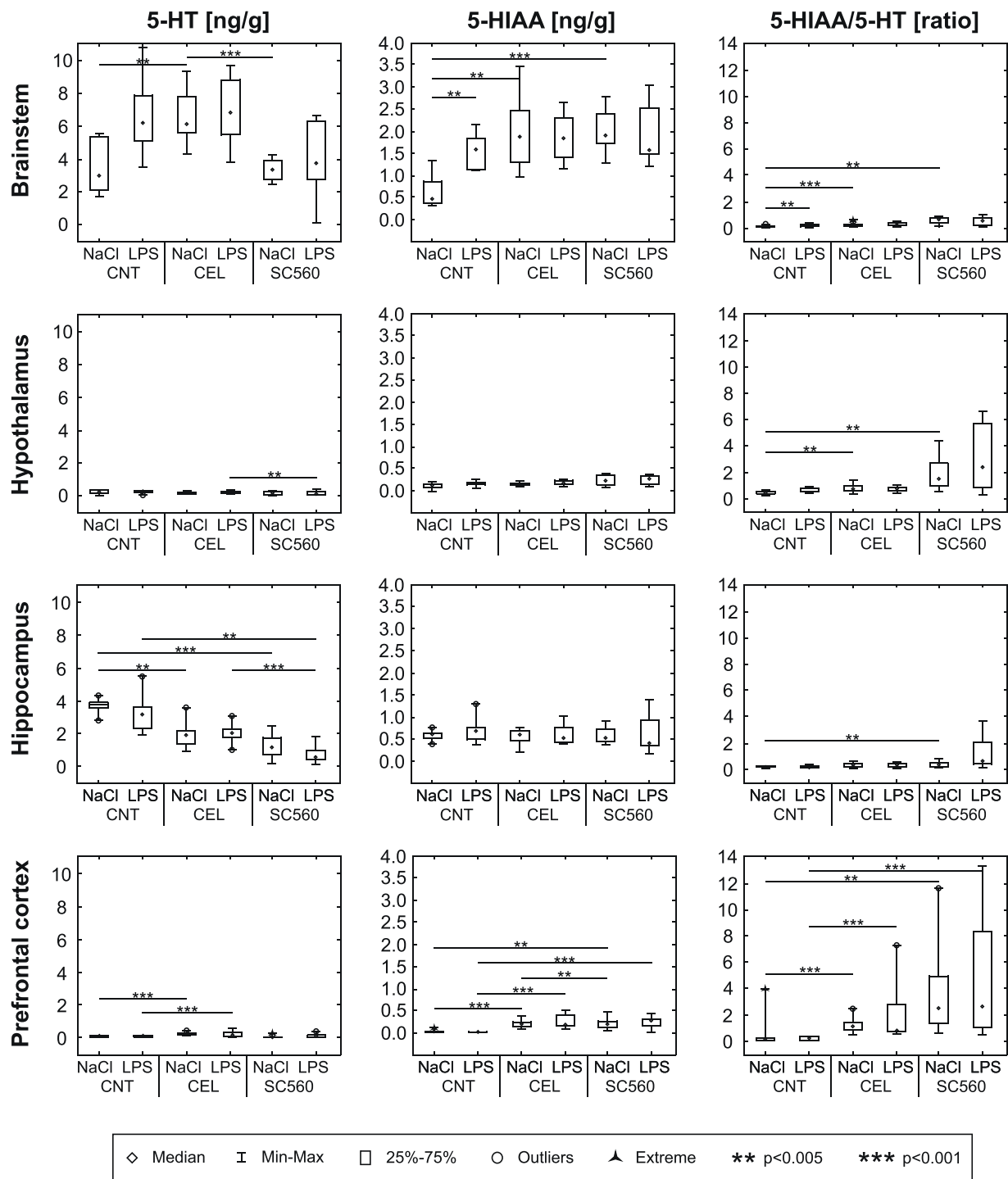


Fig. 7. The concentration of serotonin and its extracellular metabolite and the values of utilization ratios. 5-HT – serotonin, 5-HIAA – 5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HT/5-HIAA – 5-HIAA to serotonin utilization index, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% NaCl solution, LPS – single intraperitoneal LPS injection, CNT – control group, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

examined variable in any of the CNS structures (CEL+LPS vs CNT+LPS: BS $U=15$, $p = 0.363$, HPT $t = -1.962$, $p = 0.107$, HI $U=21$, $p = 0.898$, PFM $U=1$, $p = 0.054$). We observed that long-term administration of SC560 also significantly increased the HVA/DA ratio in BS, HPT, and HI, without inflammation (SC560 +NaCl vs CNT+NaCl: BS $U=0$, $p < 0.001$,

HPT $t = 3.905$, $p < 0.001$, HI $U=3$, $p = 0.005$) or regardless of inflammation (SC560 +LPS vs CNT+LPS: HPT $t = 3.806$, $p < 0.001$). Moreover, we observed that the production of experimental inflammation during long-term SC560 administration causes a greater increase in HVA/DA ratio in HPT (CEL+LPS vs SC560 +LPS: HPT $t = 4.014$,

Plasma results

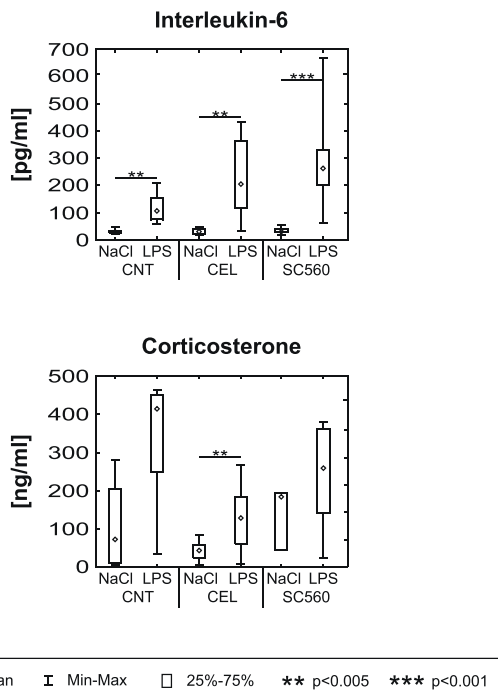


Fig. 8. The concentration of selected plasma compounds. NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% NaCl solution, LPS – single intraperitoneal LPS injection, CNT – control group, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

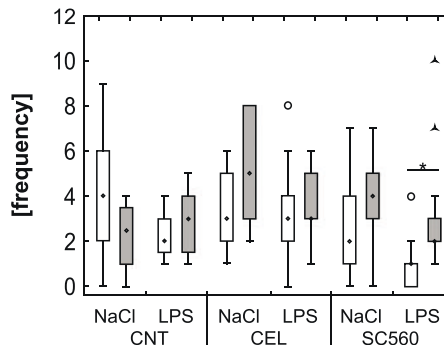
$p = 0.003$) than the production of experimental inflammation during long-term use of celecoxib. The results of intergroup comparisons using the U Mann-Whitney test (with Bonferroni's correction) for the HVA/DA ratio are presented in supplementary Table 6. Graphically presented values of the discussed variable are presented in Fig. 6.

2.3.4. 5-HIAA/5-HT results

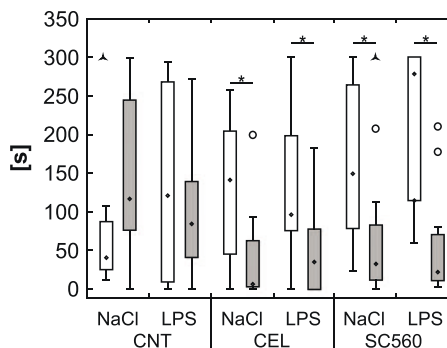
We observed a statistically significant increase in the 5-HIAA/5-HT ratio in response to peripheral inflammation only in BS (CNT+NaCl vs CNT+LPS: BS $U=6$, $p = 0.005$). We noticed that long-term administration of celecoxib significantly increased 5-HIAA/5-HT ratio in BS, HPT and PFM of animals without (CEL+NaCl vs CNT+NaCl: BS $U=5$, $p < 0.001$, HPT $t = 3.110$, $p = 0.003$, PFM $U=0$, $p < 0.001$), and with inflammation (CEL+LPS vs CNT+LPS: PFM $U=0$, $p < 0.001$). We observed that long-term administration of SC560 also significantly increased 5-HIAA/5-HT ratio in BS, HPT, HI and PFM of animals without (SC560 +NaCl vs CNT+NaCl: BS $U=6$, $p = 0.001$, HPT $t = 3.104$, $p = 0.005$, HI $U=0$, $p = 0.002$, PFM $U=0$, $p = 0.002$) and with inflammation (SC560 +LPS vs CNT+LPS: PFM $U=0$, $p < 0.001$). During the analysis of serotonin metabolism, we did not observe significant differences in the 5-HIAA/5-HT ratio between animals receiving one of the COX inhibitors without (CEL+NaCl vs SC560 +NaCl: BS $U=16$, $p = 0.031$, HPT $t = -2.663$, $p = 0.031$, HI $U=25$, $p = 0.321$, PFM $U=20$, $p = 0.139$) or with induced inflammation (CEL+LPS vs SC560 +LPS: BS $U=24$, $p = 0.095$, HPT $t = -3.123$, $p = 0.018$, HI $U=15$, $p = 0.027$, PFM $U=19$, $p = 0.114$). The results of intergroup comparisons using the U Mann-Whitney test (with Bonferroni's correction) for the 5-HIAA/5-HT ratio are presented in supplementary Table 7. Graphically presented values of the discussed variable are presented in Fig. 7.

Heatmap analysis results

Enters to right and left closed arms



Latency to first enter to right or left closed arm



Total time spent in right or left closed arm

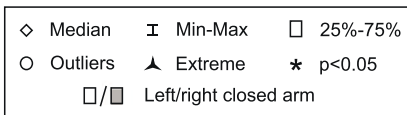
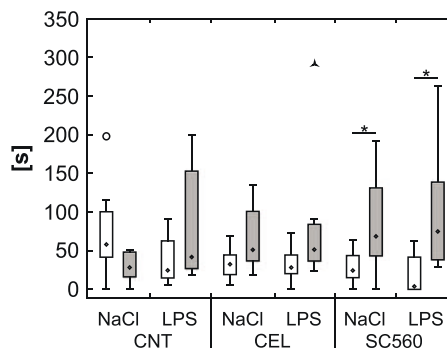


Fig. 9. The results of the analysis of animal behaviour. NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% NaCl solution, LPS – single intraperitoneal LPS injection, CNT – control group, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

Behavioural analysis results

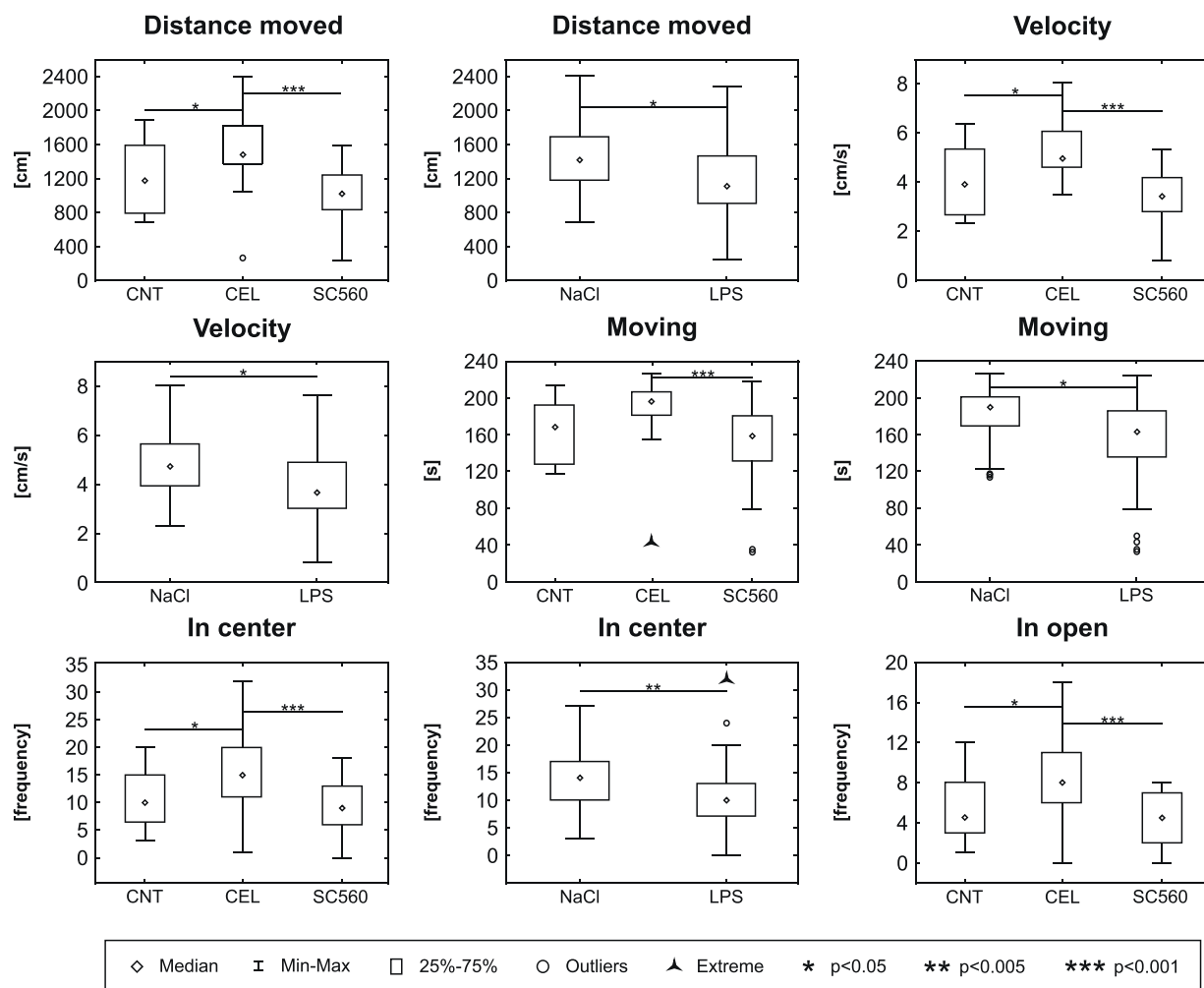


Fig. 10. The results of the analysis of selected animal behavioural variables. NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% NaCl solution, LPS – single intraperitoneal LPS injection, CNT – control group, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

3. Discussion

Many scientific reports are describing the role of the COX-1,2/PGE2 pathway in the processes related to the functioning of the body in health and disease. Due to the "epidemic" of NSAIDs abuse, we believe that the state of the body in which one or both forms of COX have been chronically inhibited deserves special attention [19,63]. Unfortunately, research on this pathway and its inhibition relate mainly to the periphery of a body and internal organs rather than to CNS. Therefore, we experimented to determine the effects of chronic COX-1 or COX-2 inhibition on the behavior of rats and the activity of their monoaminergic neurotransmission systems in the CNS.

3.1. COX-1 and COX-2 inhibitors have opposite effects on animal behaviour

The observed changes of monoaminergic neurotransmission activity within BS, HPT and PFM after the use of COX inhibitors may result in behaviour of experimental animals. The most important change that affect locomotor activity is the increase in activity of dopaminergic system in BS [53]. It was confirmed that mesencephalic locomotor region located within BS receives a descending dopaminergic projection

from substantia nigra pars compacta, which activates its cells [53]. As mentioned, an increased activity of dopaminergic system within BS was observed, which was expressed by an increase in values of DOPAC/DA and HVA/DA ratio. In addition, a higher concentration of both dopamine metabolites was observed in BS after blocking COX-1. However, once COX-2 was blocked, only an increase in DOPAC concentration was observed. Our research is consistent with those presented by [54] and [53] – in their work, the increase in dopaminergic transmission within BS increased the locomotor activity of the tested animals.

Another structure that significantly influences motor behaviour is hypothalamus [62]. In our experiment, in which we blocked activity of COX-1 and COX-2 in rats, we observed a decrease in dopamine concentration within the HPT. Moreover, we did not observe any significant changes in the concentration of dopamine metabolites, which may indicate a weakening of its release within HPT cells. According to [48], dopamine in the lateral hypothalamus reduces exploratory behaviour and locomotor activity associated with seeking food and drink.

The medial prefrontal cortex is an important element in modulating animal behaviour and the role it plays in controlling social behaviour is well known [21]. It has also been observed that blocking dopaminergic transmission to the medial prefrontal cortex by blocking dopamine receptors may facilitate locomotor activity or even cause hyperactivity in

animals [9]. During our experiment, blocking COX-2 but not COX-1 activity led to a reduction in dopaminergic transmission in PFM. This is evidenced by a significant decrease in dopamine concentration in discussed structure after long-term use of celecoxib.

Numerous scientific reports have shown that intraperitoneal administration of bacterial LPS leads to development of sickness behaviour [10,39]. It affects many aspects of mammalian life, but in our work, we focused on the motor aspect, including, decreased locomotor activity and inhibition of exploratory behaviour. As expected, induction of experimental inflammation in animals resulted in a reduction in locomotor activity. This was manifested by a significant reduction in total active time, distance traveled, and lower speed of movement compared to "healthy" animals. We observed that animals with inflammation showed less exploratory behaviour. These animals made far fewer attempts to explore both the closed and the central parts of the maze.

Interestingly, animals receiving celecoxib showed significantly greater locomotor activity than control animals and those receiving SC560. For total activity time only, no difference was observed between the control group and celecoxib-treated animals. We tested that celecoxib-treated animals showed greater exploration of all parts of the maze compared to the rest of the groups. It appears that celecoxib-treated animals were more likely to enter the open arms of the maze not because of its anxiolytic properties but because of its stimulant effect.

The analysis of the heat map and the parameters tested in it brought interesting results. After each test, the arena was cleaned to remove animal odors before the next test. Rats have a very sensitive sense of smell, therefore the preference for occupying a certain place in the maze may be related to social relationships or anxiety [45]. For animals, odors are an important source of information related to the risk of potential infection. Through the sense of smell, animals can recognize and avoid potentially infected co-species [33]. Such assumptions made it possible to record the results of social behaviour between the tested animals.

We observed that animals that were inflamed or whose COX activity was inhibited for a long time occupied the right, closed arm of the maze. Control animals were the only group occupying the left closed arm of the maze. This suggests that fully "healthy" animals isolated themselves from odors left by animals exhibiting inflammation or disruption of internal organ homeostasis caused by COX inhibitors. Regarding the avoidance of the smell of inflamed animals, it is likely related to the so-called "pathogenic disgust" which plays a key role in avoiding pathogens, pollutants, and toxins [32]. However, in the case of avoiding the smell of animals with disturbed internal organ homeostasis, it may be related to the production of urine by the kidneys. The use of COX inhibitors affects the physiology of the kidneys, and then the composition of urine excreted by animals [46]. Our proposed hypothesis concerns a change in the composition of the major urinary proteins (MUPs), compounds related to the diagnosis of the animal's condition, through the long-term use of COX-1/2 inhibitors [32]. Then, the changed content of MUPs in urine was perceived by healthy animals as a signal to start isolation. Unfortunately, now we do not have detailed information on the mechanisms responsible for the presented phenomenon.

3.2. Inhibition of COX-2, but not COX-1, causes a decrease in the activity of noradrenergic system in the brainstem and medial prefrontal cortex

Neurochemical analysis revealed a decrease in value of MHPG/NE ratio in animals receiving celecoxib during inflammation in structures related to the limbic system, i. e. BS and PFM. Likely, the inflammatory response was initially reduced by chronic COX-2 blocking. As a result, the activity of the noradrenergic system in BS and PFM could be reduced. Both structures are known to be involved in inducing adaptive mechanisms in the face of physical or mental stressors by regulating the activity of HPA [29,5,6,8]. It seems that due to the limited influence of PGE2 on these structures, the storage of NE took place within them. However, the reaction of the noradrenergic system to experimental

inflammation was still possible, as evidenced by the increase in MHPG concentration within the PFM (Fig. 4). This suggests that when the COX-1,2/PGE2 pathway has limited activity, the transmission of proinflammatory information to CNS may work via an alternative humoral (e. g. cytokines) or neuronal (e. g. vagus nerve) route and activate the noradrenergic system [15,41].

Regarding the blocking of COX-1, administration of SC560 did not affect the value of MHPG/NE ratio, the only change caused was a decrease in NE concentration in BS of animals without inflammation. It is also worth mentioning that inhibition of COX-1 causes a weaker increase in norepinephrine concentration in BS and PFM compared to blocking COX-2 during ongoing inflammation.

One mechanism that may partially explain the decline in noradrenergic activity may be the effect of PGE2 on the hypothalamus, especially the paraventricular nucleus (PVN). It is well known that there is a positive feedback loop between PVN, which releases corticotropin-releasing factor (CRF), and locus coeruleus (LC), which releases norepinephrine (see Fig. 2.b) [8]. Inhibition of PGE2 synthesis results in lack of EP3 receptors activation in PVN and no CRF secretion [59,8,37]. As a result, the activity of LC also decreases, and its stimulating noradrenergic transmission may not reach other regions innervated by it, such as the cerebral cortex, cerebellum, diencephalon, midbrain, hippocampus, or even preganglionic parasympathetic and sympathetic neurons. It appears that this mechanism may be partly responsible for the deposition of norepinephrine within the BS [65,55].

3.3. Stimulation of dopaminergic neurotransmission within the mesolimbic pathway as a result of blocking COX-1 and COX-2 activity

We observed a significant increase in intracellular (DOPAC/DA) and extracellular (HVA/DA) dopamine metabolism after long-term administration of COX inhibitors mainly in non-inflammatory rats. Blocking the activity of both COX isoforms increased intracellular dopamine metabolism in BS, HPT, HI, and PFM. It also increased extracellular dopamine metabolism in BS and HPT.

The observed increase in dopaminergic activity in BS caused by COX inhibitors may be also associated with the alteration of motor behaviour (due to the location of substantia nigra). It is worth mentioning that substantia nigra is characterized by a particularly high density of type 1 cannabinoid receptors, for which the ligand is anandamide (AEA) [60]. It can therefore be concluded that there is a relationship between the endocannabinoid system and the dopaminergic system within the substantia nigra, which is responsible for the regulation of movement [18]. It is known that COX-2 can metabolize endocannabinoids in vivo. Moreover, it can also metabolize AEA to prostamides and prostaglandin glycerol esters [22]. Therefore, inhibition of COX-2 activity may lead to an increase in the concentration of anandamide in the CNS [22]. From the research of Oz et. al., 2010 we know that anandamide inhibits dopamine reuptake in synaptic clefts. We believe that this may be one of the mechanisms by which the value of the HVA/DA ratio has increased [47]. It is worth noting that cyclooxygenases also exhibit peroxidase activity and can oxidize dopamine to quinones and semiquinones [24]. It has been found that cyclooxygenase inhibitors can reduce this reaction (see Fig. 2.a). It appears that this may be another or parallel mechanism responsible for the increase in dopaminergic signaling [24,52].

3.4. Activation of serotonergic system as an effect of cyclooxygenase inhibition

An increase in the activity of the serotonergic system was observed within BS, HPT, and PFM after long-term administration of both inhibitors, mainly in non-inflammatory rats. In the case of HI, only long-term inhibition of COX-1 activity increased the activity of a serotonergic system.

In the CNS, pericaryons of serotonergic neurons are located mainly in raphe nuclei [12]. Due to the morphology, location, and innervated

areas of the brain, they can be divided into rostral and caudal groups of raphe nuclei [25]. Both groups send serotonergic projection to the BS, but the caudal group is more closely related to this structure [25]. The main serotonergic projections made by the rostral group include the forebrain, i.e. PFM, HI, and HPT [25]. We have observed that during the long-term administration of COX inhibitors to animals, the activity of the serotonergic system (5-HIAA/5-HT ratio) increases in all analyzed CNS structures. Within BS and PFM, we observed an increase in the concentration of serotonin metabolite – 5-HIAA. Based on these observations, we assume that the above-mentioned groups of raphe nuclei are more active as a result of the long-term action of COX inhibitors. Interestingly, research by [30] indicates that COX inhibitors (especially celecoxib) may enhance 5-HT release in the brain. Of course, additional experiments will allow us to determine what is responsible for the increased activity of the serotonergic system in raphe nuclei. Is it directly related to the enhancement of 5-HT release by COX inhibitors in the brain, or is it related to a different mechanism?

In our experiment, we administered COX inhibitors to rats, which probably influenced the levels of pro-inflammatory compounds also in the CNS. The presence of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 or tumor necrosis factor, activates indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), which converts tryptophan into quinolinic and kynurenic acid, thus lowering the level of serotonin in the brain [20]. We suppose that when IDO is inactive, the degradation of tryptophan is reduced, and it is mainly used for 5-HT synthesis (see Fig. 2.c). Subsequently, the neurotransmitter may be stored in the presynaptic elements of synapses, which may explain the increase in 5-HT concentration within BS and PFM [1,69].

Only in the case of PFM, does the intraperitoneal injection of LPS during long-term use of COX inhibitors result in increased activity of the serotonergic system. It is known that LPS administered into the peritoneum can result in increased pain sensitivity, even hyperalgesia or allodynia [26,49]. Moreover, it enhances the synthesis of PGE2 on the periphery of the body and in the spinal cord, which also may result in increased pain sensation [26,28]. It is also known that PFM is a structure involved in pain processing [44].

Our results are similar with those presented by the [16], because we also observed changes in the activity of serotonergic system within PFM induced by administration of a pro-inflammatory compound during the inhibition of cyclooxygenases activity. Even though we administered COX-2 inhibitors to the animals, information about the peripheral inflammation caused by LPS reached the CNS and probably influenced the activity of serotonergic system. This is also confirmed by the increase in the concentration of 5-HT within the above-mentioned structure after inhibiting COX-2 activity and induction of experimental inflammation. The mechanism responsible for this phenomenon is probably the change in the activity of serotonin transporters (SERT) in response to the activation of the peripheral immune system. Unfortunately, this is a complex mechanism that is not yet fully understood [56,36].

4. Conclusions

The conducted research allowed us to obtain several conclusions. We observed that chronic COX-2 blocking along with experimentally induced inflammation reduced the activity of the noradrenergic system in BS and PFM. We have shown that blocking both COX isoforms leads to an increase in the activity of the dopaminergic system within BS, HPT, HI, and PFM. This fact was confirmed by an increase in the value of the DOPAC/DA ratio in the above-mentioned brain structures. On the other hand, we also observed an increase in the value of the HVA/DA ratio within BS and HPT. In the case of the serotonergic system, we noted changes in the 5-HIAA/5-HT ratio as a result of inhibition of both COX isoforms with (in HI) or without inflammation (in BS, HPT, and PFM). The most prominent change in the behaviour of the animals was the increase in locomotor activity after prolonged inhibition of COX-2 activity. We believe that such a behavioral change may be associated with

an increase in the activity of the dopaminergic system in BS, as this is where the mesencephalic locomotor region and substantia nigra is located. Unfortunately, we do not know the mechanism that would be responsible for this "stimulating" effect of the COX-2 inhibitor. As of today, we may venture to assume that it may be related to an increase in anandamide concentration.

5. Experimental procedure

3-months old male Wistar rats (Medical University of Bialystok, Poland), weighing $250 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ ($N = 90$), were individually housed in breeding cages. They had free access to food (Purina granules) and water. 12-hour day-night cycle was set, with light up at 7.00. The temperature of the animal facility room was set at $21\text{--}22^\circ\text{C}$ and humidity at $60\text{--}65\%$. Animals were habituated to the prevailing conditions for 7 days.

5.1. Experimental groups and samples collecting

For 10 days each animal received daily subcutaneous injections (s.c) from one of compounds: 0.9% sodium chloride solution, celecoxib (10 mg/kg body weight) and SC560 (3 mg/kg body weight) dissolved in $100 \mu\text{l}$ 0.9% NaCl. On this basis, three main experimental groups were created: CNT, CEL, and SC560. Then, on the 11th day of the experiment, randomly selected half of the animals from each group received a single intraperitoneal injection (i.p.) of $10 \mu\text{g}$ lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 026:B6, CNT+LPS, $n = 15$; CEL+LPS, $n = 15$; SC560 +LPS, $n = 15$) dissolved in $100 \mu\text{l}$ 0.9% NaCl. The rest of animals received only saline in the same volume (CNT+NaCl, $n = 15$; CEL+NaCl, $n = 15$; SC560 +NaCl, $n = 15$) (explanations of the experimental procedure and group comparisons that allow the testing of specific effects are provided in Fig. 3 and supplementary Table 12, respectively).

For biochemical analysis, animals were euthanized by decapitation 125 min after intraperitoneal injection. Immediately after decapitation, trunk blood and the following brain structures were collected from each animal: brainstem (BS), hypothalamus (HPT), hippocampus (HI), and medial prefrontal cortex (PFM). Each of the collected brain structures was weighed and homogenized using an ultrasonic homogenizer (Bio-Block Scientific) for 15 s in $150 \mu\text{l}$ ($200 \mu\text{l}$ for BS) and homogenization solution ($0.4 \text{ mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0.6 mM HClO_4). The homogenate was centrifuged at $12,000 \text{ rpm}$, for 15 min, at 4°C . After centrifugation, at least $100 \mu\text{l}$ of the supernatant was collected from each sample, transferred to chromatographic tubes, and frozen at -72°C until chromatographic analysis. Plasma was obtained by centrifuging the trunk blood collected on ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ($1 \text{ ml}/100 \mu\text{l}$ of Na_2EDTA); at 4000 rpm for 10 min at 4°C . Obtained plasma was frozen and stored at -72°C until future analysis.

For behavioural studies, part of animals from each group was randomly tested with an elevated plus-maze test (EPM) for 5 min, 120 min after intraperitoneal injection of LPS. Such time is required for developing molecular and behavioural signs of inflammation [66]. To avoid the effects of circadian corticosterone fluctuations, EPM tests and euthanasia were performed between 10:00 AM and 12:00 AM. At the beginning of the test, each animal was placed in the central part of the maze. Then their behaviour was recorded for 5 min. Euthanasia of animals was performed immediately after EPM. All procedures were performed with the consent of the Local Ethics Committee 73/LB582/2012.

5.2. Biochemical analysis of plasma

Plasma interleukin 6 (IL-6) was determined using the Human IL-6 ELISA Kit, from Invitrogen, according to the manufacturer's instructions. The concentration of corticosterone in the plasma of the tested animals was determined using radioimmunoassay (Corticosterone Rat/Mouse kit, DRG International), according to the

manufacturer's instructions.

5.3. Chromatographic analysis of monoamines and their metabolites

The use of reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (RP-HPLC-ED) method allowed us to examine the brain fragments in terms of concentration of main monoamines: noradrenaline (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT). Additionally, we determined the concentration of their metabolites: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA). The chromatographic system which we used consisted of a Waters Spherisorb ODS-1 RP C-18 chromatography column (4.6 × 250 mm) and Zorbax SB-C18 pre-column (4.6 × 12.5 mm) and their temperature was set to 35 °C. Mobile phase consisted of phosphate buffer (pH 3.4) containing 0.15 M NaH₂PO₄ × H₂O, 0.5 mM Na₂OSA, 0.5 mM LiCl, 0.1 M Na₂EDTA and methanol (10%). The flow of the mobile phase was set to 1 ml/min. The Carbon working electrode was set relative to Ag/AgCl reference electrode at + 65 mV. During the analysis of chromatographic data, the CHEMSTATION, REVISION-B.03.02, Agilent software was used.

5.4. Elevated Plus-maze

The Arena for the EMP test was constructed of four black painted wooden arms. Their length was 50 cm and width was 20 cm. Two of them were closed (limited by 40 cm high walls) and the other two were open (unrestricted by walls). The centerpiece of the arena was a 20 × 20 cm square. The entire area was placed 50 cm above the floor. Behaviour of the animals was studied in diffused red light. After each test, we used 70% ethanol to clean the area. The recorded animal behaviour was analyzed using EthoVision XT software. 11.5 by Noldus, The Netherlands.

5.5. Statistical analysis of the data

Our experiment was constructed for multivariate analysis of variance test (MANOVA). We used this test for the analysis of behavioural data with the Bonferroni post-hoc test with a p-value of 0.05 as statistically significant. However, we obtained that some biochemical data did not meet the criteria for applying parametric tests. We tried to use transformations leading to the normal distribution (Box-Cox transformation, natural logarithm, decimal logarithm, and square root) but it was still not possible to analyze the data using parametric tests. Only in the case of HPT, the transformations led to the normal distribution, which made it possible to use the student's T-test. Therefore, we used the U Mann-Whitney test with the Bonferroni correction (comparisons are detailed in the appendix entitled "Supplementary Tables") and for biochemical data, we established 0.005 as a statistically significant (p-value = 0.05 ÷ 9 ≈ 0.005).

CRedit authorship contribution statement

PN wrote the manuscript and performed HPLC analysis and statistical analysis of the results from HPLC, EPM test, and the content of pro-inflammatory compounds in the plasma of animals, AK wrote the manuscript and obtained the results of the behaviour of animals in the EPM test, KPK obtained the results of the concentration of pro-inflammatory compounds in the plasma of the animals, MW designed the experiment and performed the experimental procedures on living animals, and collected the samples.

Ethics approval statement

All applied experimental procedures were performed with the approval of the Local Ethical Committee, 73/ŁB582/2012.

Conflict of interest

The authors did not identify a conflict of interest.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This work was supported by the Polish National Science Center (NCN, UMO 2012/07/B/NZ4/00205).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.bbr.2022.114143](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114143).

References

- [1] S.H. Abbasi, F. Hosseini, A. Modabbernia, M. Ashrafi, S. Akhondzadeh, Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study, *J. Affect. Disord.* 141 (2–3) (2012) 308–314, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.03.033>.
- [2] S. Aid, F. Bosetti, Targeting cyclooxygenases-1 and-2 in neuroinflammation: therapeutic implications, *Biochimie* 93 (1) (2011) 46–51, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.009>.
- [3] S. Aid, R. Langenbach, F. Bosetti, Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase 2, *J. Neuroinflamm.* 5 (1) (2008) 1–14, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-17>.
- [4] R. Altman, B. Bosch, K. Brune, P. Patrignani, C. Young, Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology, *Drugs* 75 (8) (2015) 859–877, <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0392-z>.
- [5] A.F. Arnsten, Stress signaling pathways that impair prefrontal cortex structure and function, *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (6) (2009) 410–422, <https://doi.org/10.1038/nrn2648>.
- [6] A.F. Arnsten, M.A. Raskind, F.B. Taylor, D.F. Connor, The effects of stress exposure on prefrontal cortex: translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder, *Neurobiol. Stress* 1 (2015) 89–99, <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.10.002>.
- [7] A. Attiq, J. Jalil, K. Husain, W. Ahmad, Raging the war against inflammation with natural products, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 976, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00976>.
- [8] M. Atzori, R. Cuevas-Olguin, E. Esquivel-Rendon, F. Garcia-Oscos, R.C. Salgado-Delegado, N. Saderi, M. Miranda-Morales, M. Treviño, J.C. Pineda, H. Salgado, Locus coeruleus norepinephrine release: a central regulator of CNS spatio-temporal activation? *Front. Synaptic Neurosci.* 8 (2016) 25, <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00025>.
- [9] T. Bast, M.A. Pezze, J. Feldon, Dopamine receptor blockade in the rat medial prefrontal cortex reduces spontaneous and amphetamine-induced activity and does not affect prepulse inhibition, *Behav. Pharmacol.* 13 (8) (2002) 669–673, <https://doi.org/10.1097/00008877-200212000-00010>.
- [10] R.M. Bluthé, R. Dantzer, K.W. Kelley, Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat, *Brain Res.* 573 (2) (1992) 318–320, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90779-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90779-9).
- [11] P. Chandel, R.K. Rawal, R. Kaur, Natural products and their derivatives as cyclooxygenase-2 inhibitors, *Future Med. Chem.* 10 (20) (2018) 2471–2492, <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0120>.
- [12] Y. Charnay, L. Leger, Brain serotonergic circuitries, *Dialog. Clin. Neurosci.* 12 (4) (2010) 471, <https://doi.org/10.31887/DCNS.2010.12.4/ycharnay>.
- [13] S.H. Choi, S. Aid, U. Choi, F. Bosetti, Cyclooxygenases-1 and-2 differentially modulate leukocyte recruitment into the inflamed brain, *Pharm. J.* 10 (5) (2010) 448–457, <https://doi.org/10.1038/tpj.2009.68>.
- [14] M. Dagouassat, J.M. Gagliolo, S. Chrusciel, M.C. Bourin, C. Duprez, P. Caramelle, L. Boyer, S. Hue, J.B. Stern, P. Validire, D. Longrois, X. Norel, J.L. Dubois-Randé, S. Le Gouvello, S. Adnot, J. Boczkowski, The cyclooxygenase-2-prostaglandin E2 pathway maintains senescence of chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187 (7) (2013) 703–714, <https://doi.org/10.1164/rccm.201208-1361OC>.
- [15] R. Dantzer, Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa, *Physiol. Rev.* 98 (1) (2018) 477–504, <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2016>.
- [16] R. De La Garza, G.M. Asnis, The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium attenuates IFN-α induced alterations to monoamine turnover in prefrontal cortex and hippocampus, *Brain Res.* 977 (1) (2003) 70–79, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02757-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02757-4).
- [17] G. Dembo, S.B. Park, E.D. Kharasch, Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans, *J. Am. Soc. Anesthesiol.* 102 (2) (2005) 409–415, <https://doi.org/10.1097/0000542-200502000-00026>.

- [18] V. Di Marzo, M.P. Hill, T. Bisogno, A.R. Crossman, J.M. Brotchie, Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease, *FASEB J.* 14 (10) (2000) 1432–1438, <https://doi.org/10.1096/fj.14.10.1432>.
- [19] Y. Faki, A. Er, Different chemical structures and physiological/pathological roles of cyclooxygenases, *Ramban Maimonides Med. J.* (2020), <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10426>.
- [20] P.K. Feltes, J. Doorduyn, H.C. Klein, L.E. Juárez-Orozco, R.A. Dierckx, C. M. Moriguchi-Jeckel, E.F. DeVries, Anti-inflammatory treatment for major depressive disorder: implications for patients with an elevated immune profile and non-responders to standard antidepressant therapy, *J. Psychopharmacol.* 31 (9) (2017) 1149–1165, <https://doi.org/10.1177/0269881117711708>.
- [21] T.B. Franklin, B.A. Silva, Z. Perova, L. Marrone, M.E. Masferrer, Y. Zhan, A. Kaplan, L. Greetham, V. Verrechia, A. Halman, S. Pagella, A.L. Vysotski, A. Illarionova, V. Grinevich, T. Branco, C.T. Gross, Prefrontal cortical control of a brainstem social behavior circuit, *Nat. Neurosci.* 20 (2) (2017) 260–270, <https://doi.org/10.1038/nn.4470>.
- [22] S.T. Glaser, M. Kaczocha, Cyclooxygenase-2 mediates anandamide metabolism in the mouse brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335 (2) (2010) 380–388, <https://doi.org/10.1124/jpet.110.168831>.
- [23] M. Goetz Moro, P.K. Vargas Sánchez, A.C. Lupepsa, E.M. Baller, G.C. Nobre Franco, Cyclooxygenase biology in renal function-literature review, *Rev. Colomb. De. Nefrol.* 4 (1) (2017) 27–37, <https://doi.org/10.22265/acnef.4.1.263>.
- [24] T.G. Hastings, Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase, *J. Neurochem.* 64 (2) (1995) 919–924, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64020919.x>.
- [25] J.P. Hornung, Chapter - the neuroanatomy of the serotonergic system. Handbook of Behavioral Neurobiology, Elsevier, 2010, pp. 51–64, [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70071-0](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70071-0).
- [26] C.T. Hsieh, Y.J. Lee, X. Dai, N.B. Ojeda, H.J. Lee, L.T. Tien, L.W. Fan, Systemic lipopolysaccharide-induced pain sensitivity and spinal inflammation were reduced by minocycline in neonatal rats, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (10) (2018) 2947, <https://doi.org/10.3390/ijms19102947>.
- [27] D. Huang, L. Zhang, J.Q. Yang, Y. Luo, T. Cui, T.T. Du, X.H. Jiang, Evaluation on monoamine neurotransmitters changes in depression rats given with sertraline, meloxicam or/and caffeic acid, *Genes Dis.* 6 (2) (2019) 167–175, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.005>.
- [28] Y. Jang, M. Kim, S.W. Hwang, Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception, *J. Neuroinflamm.* 17 (1) (2020) 1–59, <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1703-1>.
- [29] R. Jankord, J.P. Herman, Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1148 (2008) 64–73, <https://doi.org/10.1196/annals.1410.012>.
- [30] D. Johansson, A. Falk, M.M. Marcus, T.H. Svensson, Celecoxib enhances the effect of reboxetine and fluoxetine on cortical noradrenaline and serotonin output in the rat, *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39 (1) (2012) 143–148, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.06.003>.
- [31] P. Kalinski, Regulation of immune responses by prostaglandin E2, *J. Immunol.* 188 (1) (2012) 21–28, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>.
- [32] M. Kavaliers, K.P. Ossenkopp, E. Choleris, Social neuroscience of disgust, *Genes. Brain Behav.* 18 (1) (2019) 1–13, <https://doi.org/10.1111/gbb.12508>.
- [33] M. Kavaliers, K.P. Ossenkopp, E. Choleris, Pathogens, odors, and disgust in rodents, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 119 (2020) 281–293, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.037>.
- [34] S. Kim, K.W. Joo, Electrolyte and acid-base disturbances associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Electrolytes Blood Press.* 5 (2) (2007) 116–125, <https://doi.org/10.5049/EBP.2007.5.2.116>.
- [35] A. Koeberle, O. Wertz, Perspective of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders, *Biochem. Pharmacol.* 98 (2015) 1–15, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.06.022>.
- [36] G.A. Korte-Bouws, F. Van Heesch, K.G. Westphal, L.M. Ankersmit, E.M. Van Oosten, O. Güntürkün, S.M. Korte, Bacterial lipopolysaccharide increases serotonin metabolism in both medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in male wild type rats, but not in serotonin transporter knockout rats, *Pharmaceuticals* 11 (3) (2018) 66, <https://doi.org/10.3390/ph11030066>.
- [37] L. Lv, D. Bai, Y. Ma, K. Liu, Y. Ma, The PGE2 receptor EP3 plays a positive role in the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activity in the hypothalamus under immobilization stress, *Brain Res. Bull.* 168 (2021) 45–51, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.12.014>.
- [38] Y. Ma, T. Matsuwaki, K. Yamanouchi, M. Nishihara, Differential roles of cyclooxygenase-2-related signaling in regulating hypothalamic neuronal activity under various acute stresses, *J. Vet. Med. Sci.* (2013) 13–0234, <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0234>.
- [39] M. Maes, M. Berk, L. Goehler, C. Song, G. Anderson, P. Galecki, B. Leonard, Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways, *BMC Med.* 10 (1) (2012) 1–19, <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-66>.
- [40] J. Martel-Pelletier, J.P. Pelletier, H. Fahmi, Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. Seminars in Arthritis and Rheumatism, Elsevier, 2003, pp. 155–167, [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(03\)00134-3](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(03)00134-3).
- [41] P.B. Mello-Carpes, I. Izquierdo, The nucleus of the solitary tract → nucleus paragigantocellularis → locus coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory, *Neurobiol. Learn. Mem.* 100 (2013) 56–63, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.12.002>.
- [42] W.P. Meuwesen, J.M. Du Plessis, J.R. Burger, M.S. Lubbe, M. Cockeran, Prescribing patterns of non-steroidal anti-inflammatory drugs in chronic kidney disease patients in the South African private sector, *Int. J. Clin. Pharm.* 38 (4) (2016) 863–869, <https://doi.org/10.1007/s11096-016-0298-1>.
- [43] N.A. Northrop, B.K. Yamamoto, Cyclooxygenase activity contributes to the monoaminergic damage caused by serial exposure to stress and methamphetamine, *Neuropharmacology* 72 (2013) 96–105, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.040>.
- [44] W.Y. Ong, C.S. Stohler, D.R. Herr, Role of the prefrontal cortex in pain processing, *Mol. Neurobiol.* 56 (2) (2019) 1137–1166, <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1130-9>.
- [45] G.M. Otto, C.L. Franklin, C.B. Clifford, Biology and diseases of rats, *Lab. Anim. Med.* 2015 (2015) 151–207, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00004-3>.
- [46] S.E. Owumi, U.J. Dim, Biochemical alterations in diclofenac-treated rats: effect of selenium on oxidative stress, inflammation, and hematological changes, *Toxicol. Res. Appl.* 3 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1177/2397847319874359>.
- [47] M. Oz, V. Jaligam, S. Galadari, G. Petroianu, Y.M. Shuba, T.S. Shippenberg, The endogenous cannabinoid, anandamide, inhibits dopamine transporter function by a receptor-independent mechanism, *J. Neurochem.* 112 (6) (2010) 1454–1464, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06557.x>.
- [48] M.A. Parada, L. Hernandez, M.P. De Parada, X. Paez, B.G. Hoebel, Dopamine in the lateral hypothalamus may be involved in the inhibition of locomotion related to food and water seeking, *Brain Res. Bull.* 25 (6) (1990) 961–968, [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90195-6](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90195-6).
- [49] S. Paredes, S. Cantillo, K.D. Candido, N.N. Knezevic, An Association of serotonin with pain disorders and its modulation by estrogen, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (22) (2019) 5729, <https://doi.org/10.3390/ijms20225729>.
- [50] C. Patrono, Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 82 (4) (2016) 957–964, <https://doi.org/10.1111/bcp.13048>.
- [51] E. Ricciotti, G.A. Fitzgerald, Prostaglandins and inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (5) (2011) 986–1000, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
- [52] B.M. Ross, R.J. Brooks, M. Lee, K.S. Kalasinsky, S.P. Vorce, M. Seeman, P. J. Fletcher, S.D. Turenne, Cyclooxygenase inhibitor modulation of dopamine-related behaviours, *Eur. J. Pharmacol.* 450 (2) (2002) 141–151, [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02104-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02104-0).
- [53] D. Ryzcko, R. Dubuc, Dopamine and the brainstem locomotor networks: from lamprey to human, *Front. Neurosci.* 11 (2017) 295, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00295>.
- [54] D. Ryzcko, S. Grätsch, F. Auclair, C. Dubé, S. Bergeron, M.H. Alpert, J.J. Cone, M. F. Roitman, S. Alford, R. Dubuc, Forebrain dopamine neurons project down to a brainstem region controlling locomotion, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (34) (2013) 3235–3242, <https://doi.org/10.1073/pnas.1301125110>.
- [55] E.R. Samuels, E. Szabadi, Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation, *Curr. Neuropharmacol.* 6 (3) (2008) 235–253, <https://doi.org/10.2174/157015908785777229>.
- [56] R. Schwamborn, E. Brown, J. Haase, Elevation of cortical serotonin transporter activity upon peripheral immune challenge is regulated independently of p38 mitogen-activated protein kinase activation and transporter phosphorylation, *J. Neurochem.* 137 (3) (2016) 423–435, <https://doi.org/10.1111/jnc.13596>.
- [57] E. Sehic, M. Szekely, A.L. Ungar, A. Oladehin, C.M. Blatteis, Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs, *Brain Res. Bull.* 39 (6) (1996) 391–399, [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(96\)00037-8](https://doi.org/10.1016/0361-9230(96)00037-8).
- [58] R. Sethi, N. Gómez-Coronado, A. Walker, O. J. D'arcy Robertson, B. Agustini, M. Berk, S. Dodd, Neurobiology and therapeutic potential of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors for inflammation in neuropsychiatric disorders, *Front. Psychiatry* 10 (2019) 605, <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00605>.
- [59] T. Shimizu, K. Tanaka, K. Nakamura, K. Taniuchi, T. Yawata, Y. Higashi, T. Ueba, F. Dimitriadis, S. Shimizu, K. Yokotani, M. Saito, Possible involvement of brain prostaglandin E2 and prostanoid EP3 receptors in prostaglandin E2 glycerol ester-induced activation of central sympathetic outflow in the rat, *Neuropharmacology* 82 (2014) 19–27, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.03.005>.
- [60] I. Smaga, J. Jastrzębska, M. Zaniewska, B. Bystrowska, D. Gawliński, A. Faron-Górecka, Z. Broniowska, J. Miszkiewicz, M. Filip, Changes in the brain endocannabinoid system in rat models of depression, *Neurotox. Res.* 31 (3) (2017) 421–435, <https://dx.doi.org/10.1007%2F12640-017-9708-y>.
- [61] D.H. Solomon, S. Schneeweiss, R. Levin, J. Avorn, Relationship between COX-2 specific inhibitors and hypertension, *Hypertension* 44 (2) (2004) 140–145, <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000136134.31846.83>.
- [62] Y. Tahara, A. Hirao, T. Moriya, T. Kudo, S. Shibata, Effects of medial hypothalamic lesions on feeding-induced entrainment of locomotor activity and liver Per2 expression in Per2: luc mice, *J. Biol. Rhythms* 25 (1) (2010) 9–18, <https://doi.org/10.1177/0748730409352782>.
- [63] P.K. Uduagbamen, B.L. Salako, M.A. Hamzat, S. Kadiri, F.A. Arogundade, Kidney function in frequent users of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), *Open J. Intern. Med.* 10 (2020) 69–82, <https://doi.org/10.4236/ojim.2020.101007>.
- [64] T. Watanabe, A. Morimoto, K. Morimoto, T. Nakamori, N. Murakami, ACTH release induced in rats by noradrenaline is mediated by prostaglandin E2, *J. Physiol.* 443 (1) (1991) 431–439, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018842>.
- [65] K.N. Westlund, J.D. Coulter, Descending projections of the locus coeruleus and subcoeruleus/medial parabrachial nuclei in monkey: axonal transport studies and

- dopamine- β -hydroxylase immunocytochemistry, *Brain Res. Rev.* 2 (1–3) (1980) 235–264, [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(80\)90009-0](https://doi.org/10.1016/0165-0173(80)90009-0).
- [66] M. Wiczorek, A.J. Dunn, Effect of subdiaphragmatic vagotomy on the noradrenergic and HPA axis activation induced by intraperitoneal interleukin-1 administration in rats, *Brain Res.* 1101 (1) (2006) 73–84, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.120>.
- [67] H. Yang, C. Chen, Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling, *Curr. Pharm. Des.* 14 (2008) 1443–1451, <https://doi.org/10.2174/138161208784480144>.
- [68] Y. Zhou, D.M. Boudreau, A.N. Freedman, Trends in the use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the general US population, *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 23 (1) (2014) 43–50, <https://doi.org/10.1002/pds.3463>.
- [69] Y. Zhu, R. Yao, Y. Li, C. Wu, L. Heng, M. Zhou, L. Yan, Y. Deng, Z. Zhang, L. Ping, Y. Wu, S. Wang, L. Wang, Protective effect of celecoxib on early postoperative cognitive dysfunction in geriatric patients, *Front. Neurol.* 9 (2018) 633, <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00633>.

Behavioural Brain Research

Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	cyclooxygenases; prostaglandin E2; chromatography; neurotransmission; amino acids
Corresponding Author:	Paweł Napora, MSc University of Lodz Faculty of Biology and Environmental Protection Lodz, POLAND
First Author:	Paweł Napora, MSc
Order of Authors:	Paweł Napora, MSc Anna Kobrzycka, PhD Krystyna Pierzchała-Koziec, prof Marek Wieczorek, prof
Abstract:	<p>In mammals, both isoforms of cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1,2) play an important role in maintaining the homeostasis of peripheral organs. It is also known that both isoforms are involved in the regulation of the immune response and processes related to neuroimmune communication. A particularly interesting compound formed as a result of COX-1,2 activity is prostaglandin E2 (PGE2). As reported in the scientific literature, the role of PGE2 in immune processes does not only refer to the induction of peripheral but also central effects. Therefore, in our work, we investigated the effects of chronic and selective inhibition of COX-1 (SC560 administration) and COX-2 (celecoxib administration) on amino acid neurotransmission systems in selected brain structures. Long-term administration of COX inhibitors affected the concentration of 1) aspartate, glycine, and tyrosine in the amygdala, 2) glycine and GABA in the brainstem, 3) glutamate, aspartate, glycine, tyrosine, GABA, and tryptophan in the hippocampus, 4) glutamate, glycine, tyrosine, GABA, and tryptophan within the hypothalamus, 5) aspartate, glutamate, tyrosine, and GABA within the periaqueductal gray matter. We suggest that the effect of the inhibitors on the concentration of the tested amino acids is not only related to the side effects they cause on the body's periphery. It has been observed that long-term inhibition of the activity of one of the COX isoforms may cause different central effects despite catalyzing the same chemical reaction by these enzymes.</p>
Suggested Reviewers:	Ronald Gaykema, PhD brant@virginia.edu Justyna Rogalska, PhD rogal@umk.pl Lisa Goehler, PhD lg7x@eservices.virginia.edu



**FACULTY OF BIOLOGY
AND ENVIRONMENTAL
PROTECTION**

University of Lodz

Marek Wieczorek, Ph. D. and Paweł Napora, M.Sc.
Department of Neurobiology, University of Lodz
e-mail: marek.wieczorek@biol.uni.lodz.pl
and: pawel.napora@edu.uni.lodz.pl

C. P. Müller, PhD
Editor-in-Chief
Behavioural Brain Research

Dear Dr. C. P. Müller

We hereby enclose a manuscript entitled "*Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain*" submitted to Behavioral Brain Research. We report data defining neurochemical changes in the activity of the amygdala, brainstem, hypothalamus, hippocampus, and periaqueductal gray matter in response to chronic inhibition of cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1,2) activity. In addition, we present the influence of experimentally induced inflammation on the activity of the structures of the central nervous system (CNS). We believe that the submitted manuscript complements an earlier paper approved by your journal entitled "*Effects of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behavior and the monoaminergic systems of the rat brain*".

The currently submitted manuscript relates to topics related to behavioral neuroscience. In the work, we repeatedly refer to the relationships between neurochemical changes in specific CNS structures and the behavioral consequences that may accompany these changes. Our research included a neurochemical analysis of amino acids present in the CNS, which, combined with previous work, will 'shed more light' on the relationship between the brain and behaviour.

We believe that the data presented in the next paper are valuable because they show that chronic use of cyclooxygenase inhibitors affects not only the body's circuit, but also the amino acid neurotransmission systems and the content of other amino acids such as tyrosine, tryptophan or aspartate. Once again, we also raise issues related to the mechanisms of compensation for humoral disorders of the neuromuscular communication pathway, which are still debatable. In the submitted manuscript, we describe the effect of chronic blocking of COX-1 or COX-2 activity on the content of aspartate, glutamate, glycine, tyrosine, gamma-aminobutyric acid, and tryptophan. The results obtained by us are the basis for further research related to understanding the mechanisms of neuro-immune communication and indicate the important role of prostaglandins, in particular prostaglandin E2 (PGE2), in the activity of CNS structures and animal behavior.

The submitted manuscript seems well suited to the field of brain research as the COX-1,2/PGE2 pathway plays a key role in relaying information from the activated immune system to the CNS. Inhibition of this pathway significantly affects the activity of amino acid systems of neurotransmission systems, and the content of other amino acids in the CNS. We believe that this phenomenon is one of the elements causing the changes in animal behavior observed

Department of Neurobiology, University of Lodz
141/143 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland
phone: +48 42 665 56 70, fax: +48 42 665 56 71,
e-mail: marek.wieczorek@biol.uni.lodz.pl or pawel.napora@edu.uni.lodz.pl

➔ www.uni.lodz.pl

in an earlier scientific paper. We are convinced that the presented data describing the inhibition of the COX-1,2/PGE2 pathway touch on a very current population problem, which is the so-called "epidemic" of abuse of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

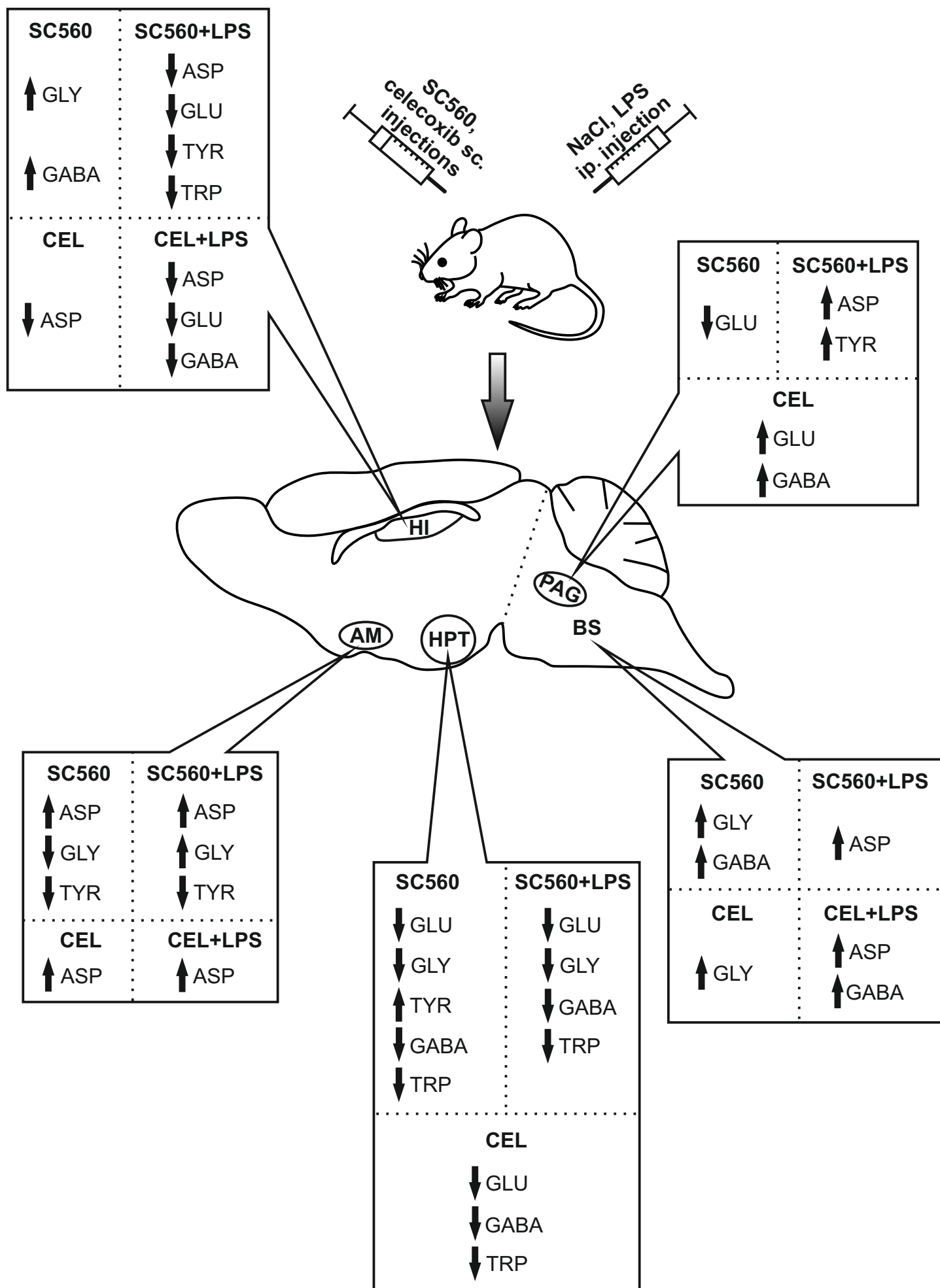
We consider the experiment designed by us to be innovative and show that chronic inhibition of the activity of the COX-1,2-PGE2 pathway leads to the formation of serious changes that also affect the central part of the body – the CNS. We inform the editors that each of the co-authors has approved the final version of this manuscript and has no conflicting interests.

We also kindly inform the Editors that after the manuscript is approved, it is possible to present detailed experimental data. This manuscript has never been submitted to other journals before.

Thank you for your time and consideration.

Yours faithfully,

Marek Wieczorek and Paweł Napora



1 Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain

2 Paweł Napora^{a*}, Anna Kobrzycka^a, Krystyna Pierzchała-Koziec^b, Marek Wieczorek(ORCID:
3 0000-0002-0862-8076)^{a*}

4 ^a Department of Neurobiology, University of Łódź, Faculty of Biology and Environmental Protection, Pomorska
5 street 141/143, 90-236 Łódź, Poland

6 ^b Department of Animal Physiology and Endocrinology, University of Agriculture in Kraków, 24/28 Adam
7 Mickiewicz Avenue, 30-059 Kraków, Poland

8 * *Corresponding authors:*

9 pawel.napora@edu.uni.lodz.pl and marek.wieczorek@biol.uni.lodz.pl

10 *Highlights*

- 11 • In response to chronic inhibition of cyclooxygenases, the amygdala uses aspartate rather
12 than glutamate
- 13 • Inhibition of the humoral neuro-immune pathway induces potential compensatory
14 mechanisms in the brainstem
- 15 • Disturbed homeostasis caused by COX-1 inhibition is a stronger signal for HPT than
16 COX-2 inhibition.

17 *Abstract*

18 In mammals, both isoforms of cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1,2) play an important role in
19 maintaining the homeostasis of peripheral organs. It is also known that both isoforms are
20 involved in the regulation of the immune response and processes related to neuroimmune
21 communication. A particularly interesting compound formed as a result of COX-1,2 activity is
22 prostaglandin E2 (PGE2). As reported in the scientific literature, the role of PGE2 in immune
23 processes does not only refer to the induction of peripheral but also central effects. Therefore,
24 in our work, we investigated the effects of chronic and selective inhibition of COX-1 (SC560
25 administration) and COX-2 (celecoxib administration) on amino acid neurotransmission
26 systems in selected brain structures. Long-term administration of COX inhibitors affected the
27 concentration of 1) aspartate, glycine, and tyrosine in the amygdala, 2) glycine and GABA in
28 the brainstem, 3) glutamate, aspartate, glycine, tyrosine, GABA, and tryptophan in the
29 hippocampus, 4) glutamate, glycine, tyrosine, GABA, and tryptophan within the hypothalamus,
30 5) aspartate, glutamate, tyrosine, and GABA within the periaqueductal gray matter. We suggest
31 that the effect of the inhibitors on the concentration of the tested amino acids is not only related

32 to the side effects they cause on the body's periphery. It has been observed that long-term
33 inhibition of the activity of one of the COX isoforms may cause different central effects despite
34 catalyzing the same chemical reaction by these enzymes.

35 Key words: cyclooxygenases, prostaglandin E2, chromatography, neurotransmission, amino
36 acids

37 *Abbreviations*

38 COX-1,2 — cyclooxygenases 1,2

39 CNS — central nervous system

40 PGE2 — prostaglandin E2

41 LPS — lipopolysaccharide (*Escherichia coli* 026:B6)

42 IL-1 β — interleukin 1 β

43 SB — sickness behaviour

44 PVN — paraventricular nucleus

45 CRF — corticotropin-releasing factor

46 ACTH — adrenocorticotrophic hormone

47 CVOs — circumventricular organs

48 BBB — blood-brain barrier

49 HPA — hypothalamic-pituitary-adrenal axis

50 NTS — nucleus tractus solitarii

51 AMb — ambiguous nucleus

52 NSAIDs — non-steroidal anti-inflammatory drugs

53 SC560 — (5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole)

54 CEL — 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide

55 ASP — aspartate

56 GLU — glutamate

57 GLY — glycine

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
- TYR — tyrosine
 - GABA — gamma-aminobutyric acid
 - TRP — tryptophan
 - TNF- α — tumor necrosis factor α
 - AM — amygdala
 - BS — brainstem
 - HI — hippocampus
 - IDO — indolamine 2,3-dioxygenase
 - HPT — hypothalamus
 - PAG — periaqueductal gray matter

68 *1. Introduction*

69 In mammals, both isoforms of cyclooxygenases 1 and 2 (COX-1,2) are responsible for
70 the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. They are well known for their role in
71 regulating the homeostasis of many internal organs, such as the kidneys, stomach and also the
72 central nervous system (CNS) [ZIDAR et al. 2009, GRAHAM and HICKEY, 2003]. Moreover,
73 both isoforms are involved in the regulation of the body's immune response and in the processes
74 related to neuroimmune communication [MEDEIROS et al. 2012]. A particularly important
75 compound that arises as a result of their activity is prostaglandin E2 (PGE2). Its production
76 increases significantly in response to pro-inflammatory factors, such as lipopolysaccharide
77 (LPS) or pro-inflammatory cytokines e.g. interleukin 1 β (IL-1 β). It is one of the key compounds
78 regulating the activity of the immune system. The influence of PGE2 consists in stimulating the
79 secretion of cytokines, accelerating migration and promoting maturation of immune cells. In
80 addition, it has a chemotactic effect at its place of occurrence [KALINSKI 2012, AGARD et
81 al. 2013]. It also has the ability to induce unpleasant sensory experiences signaling the threat to
82 the body — inflammatory pain [KAWABATA 2011].

83 It has long been known that inflammation, which arises on the periphery of the body,
84 affects the CNS inducing a characteristic set of behaviours known as a sickness behaviour (SB)
85 [DANTZER et al. 2008]. Neuromodulatory compounds, such as cytokines and prostaglandins,
86 are mediated in the genesis of the disease, in particular the aforementioned PGE2. Its

87 characteristic symptoms are weight loss, anorexia, anhedonia, hyperalgesia, decreased
88 locomotor activity, and fever [PECCHI et al. 2009, MAES et al. 2012]. Interestingly, PGE2
89 plays a key role in causing inflammation-related fever. Results of many studies shows that
90 PGE2-induced fever is independent of the sensory part of the vagus nerve [OOTSUKA et al.
91 2008]. Several possibilities may lead to an increase in the concentration of PGE2 in the CNS
92 and induction of fever: 1) due to the highly lipophilic properties of PGE2, it can penetrate the
93 blood-brain barrier, 2) migration of PGE2 to the CNS within the circumventricular organs, 3)
94 synthesis and release of PGE2 at the level of CNS by brain endothelial cells [BLOMQVIST
95 and ENGBLOM 2018]. The PGE2 molecules then bind to EP3 receptors in the preoptic area of
96 the hypothalamus (HPT). There are thermoregulatory neurons that, as a result of the activation
97 of EP3 receptors, lead to an increase in the animal's body temperature [BLOMQVIST and
98 ENGBLOM 2018]. Moreover, PGE2, when diffused into the CNS, can also stimulate the
99 activity of the HPA axis. It is associated with the presence of EP3 receptors in the initial part
100 of the HPA axis - paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus [LV et al. 2021].
101 Activation of these receptors by PGE2 causes the secretion of corticotropin-releasing factor
102 (CRF) from specialized neurons located in PVN. The CRF then acts on the anterior pituitary
103 gland, which secretes the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which in turn stimulates the
104 adrenal cortex to secrete glucocorticoids [ELANDER et al. 2009].

105 The role of PGE2 does not end with the transmission of a pro-inflammatory signal to
106 the CNS through the blood-brain barrier (BBB). It is also produced in the CNS by microglia,
107 astrocytes, and endothelial cells [PECCHI et al. 2009, ANDREASSON et al. 2010].
108 Interestingly, astrocytes present in the hypothalamus can release PGE2 initiated by neurons.
109 Subsequently, after the release of PGE2 by the glia, the release of gonadotropin-releasing
110 hormone may be stimulated. It is a hormone released from hypothalamic neuroendocrine
111 neurons that control mammalian reproduction [CLASADONTE et al. 2011].

112 For this reason, the synthesis of PGE2 is crucial not only for normal peripheral
113 inflammatory mechanisms but can also significantly influence mammalian behaviour
114 CLASADONTE et al. 2011, NAPORA et al. 2023]. Therefore, it is worth considering the
115 relationship between the PGE2 molecule and the activity of neurotransmission systems and the
116 behaviour of animals. Research performed by HUANG et al. 2019 describes the relationship
117 between the peripheral inhibition of the activity of both COXs and the formation of changes in
118 the activity of monoaminergic neurotransmission systems (e.g. noradrenergic and
119 serotonergic). This research also claims that the use of such anti-inflammatory therapy can

120 improve behaviour during depression [HUANG et al. 2019]. Scientific literature also provides
121 evidence of interactions between the COX-1-PGE2-EP1 receptors pathway and the
122 dopaminergic system. It turns out that rats with a genetic deletion of COX-1 or EP1 receptors,
123 especially in the prefrontal cortex, do not show normally occurring behaviour in response to
124 social stress (repeated social failure) - abolishing social avoidance [TANAKA et al. 2012]. The
125 reduction in the number of EP1 receptors also resulted in a reduced anxiety effect in response
126 to social stress. The authors of this study report that it is related to the mesocortical
127 dopaminergic pathway, in which, as a result of social stress, the dopaminergic transmission
128 dependent on EP1 and PGE2 receptors decreases. But when the density of EP1 receptors is
129 reduced or the COX-1—PGE2—EP1 pathway is otherwise disturbed, the dopaminergic
130 transmission will not be impaired, and thus anxiety or avoidance behaviour will not occur
131 [TANAKA et al. 2012].

132 The literature review indicates that the PGE2 molecule has a significant impact on the
133 activity of neurotransmission systems, including noradrenergic, dopaminergic, and serotonergic
134 [HILLIER and TEMPLETON 1980, KITAOKA et al. 2007, WOODLING et al. 2016, SINGH
135 et al. 2017]. Unfortunately, the influence of PGE2 on the activity of aminoacidergic
136 neurotransmission systems is still not well understood and requires closer examination. As
137 mentioned before, interfering with the COX-1/2-dependent PGE2 synthesis pathway makes it
138 possible to study the effects of this molecule. In our research, we decided to use inhibitors of
139 COX-1 (SC560) and COX-2 (celecoxib) activity. Moreover, we focused on their chronic effects
140 on the body, especially the CNS, rather than on the more commonly studied acute effects. We
141 consider the long-lasting impact of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) to be of
142 particular interest as there is an increasing use of this class of drugs each year (some call it "the
143 NSAIDs use epidemic"). This situation is associated with their easy availability and no
144 prescription requirement, but also with the occurrence of diseases accompanied by chronic pain
145 and inflammation [CRYER et al. 2016].

146 Therefore, in this study, we would like to focus on the contribution of COX-1/2 to the
147 development of inflammation and its effects on amino acid neurotransmission in the CNS. To
148 this end, we chronically inhibited the activity of COX-1 (SC560 subcutaneous injection) and
149 COX-2 (celecoxib subcutaneous injection) in rats with or without experimentally induced
150 inflammation (intraperitoneal injection of LPS). The CNS structures we chose were associated
151 with immunomodulatory and immunosensory processes or induction of defensive behaviours
152 in the course of the disease, in particular sickness behaviour.

153 We expected that as a result of long-lasting administration of NSAIDs to rats, and thus
154 disruption of the humoral neuroimmune communication pathway, we will observe an induction
155 of compensatory mechanisms for this disorder. It seems to us that by weakening one of the
156 pathways that transmits threat information to the CNS, the body will improve the functioning
157 of other pathways that perform the same or similar role. Such compensation may relate to the
158 improvement of the neuronal pathway of neuroimmune communication, which may be
159 manifested by increased activity of amino acid neurotransmission systems within specific CNS
160 structures.

161 2. Results

162 2.1. Aspartate

163 We did not observe the influence of experimentally induced inflammation on aspartate (ASP)
164 concentration in any of the analyzed CNS structures (CNT+NaCl vs CNT+LPS). Long-lasting
165 administration of celecoxib affected the concentration of ASP, caused an increase in AM and
166 its decrease in HI, regardless of inflammation (CNT+LPS vs CEL+LPS: AM $U=0$, $p<0.001$, HI
167 $U=0$, $p<0.001$) or not-inflammatory (CNT+NaCl vs CEL+NaCl: AM $U=0$, $p<0.001$, HI $U=0$,
168 $p<0.001$) conditions compared to control saline-injected group. Long-lasting administration of
169 SC560 increased the concentration of ASP in AM and PAG and caused its decrease in HI
170 (CNT+LPS vs SC560+LPS: AM $U=4$, $p<0.001$, PAG $U=6$, $p<0.001$, HI $U=10$, $p<0.001$) only
171 in animals with inflammation. Chronic administration of SC560 to animals without
172 inflammation decreased the concentration of ASP in AM (CEL+NaCl vs SC560+NaCl: AM
173 $U=4$, $p<0.001$) and increased it in HI (CEL+NaCl vs SC560+NaCl: HI $U=38$, $p=0.003$)
174 compared to celecoxib. It has been observed that long-lasting administration of SC560 alone
175 has no effect, while its administration to inflammatory animals increases the concentration of
176 ASP in AM and PAG (SC560+NaCl vs SC560+LPS: AM $U=10$, $p<0.001$, PAG $U=23$,
177 $p<0.001$). It was also observed that animals receiving SC560 during inflammation had a higher
178 concentration of ASP in HI than those receiving celecoxib (CEL+LPS vs SC560+LPS: HI $U=0$,
179 $p=0$). The results of intergroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni
180 correction) for the ASP concentration are presented in Tables 2-6. Graphically presented values
181 of the discussed variable are shown in Figure 3.

182 2.2. Glutamate

183 We observed that experimentally induced inflammation causes a decrease in glutamate (GLU)
184 concentration in HPT (CNT+NaCl vs CNT+LPS: HPT U=4, p<0.001). We observed that
185 chronic administration of celecoxib reduced the GLU concentration in the HPT in non-inflamed
186 animals (CNT+NaCl vs CEL+NaCl: HPT U=2, p<0.001) and produced the same effect in HPT
187 and HI in inflamed animals (CNT+LPS vs CEL+LPS: HPT U=0, p<0.001, HI U=3, p<0.001).
188 Long-lasting administration of SC560 lowered GLU concentration in HPT and PAG in non-
189 inflamed animals (CNT+NaCl vs SC560+NaCl: HPT U=0, p<0.001, PAG U=7, p<0.001) and
190 in HI and HPT in inflamed animals (CNT+LPS vs SC560+LPS: HI U= 14, p=0.002, HPT U=0,
191 p=0). We observed that in AM celecoxib decreased the concentration of GLU more strongly
192 (CEL+NaCl vs SC560+NaCl: AM U=10, p<0.001), while in HPT and PAG, administration of
193 SC560 resulted in a stronger reduction of the examined parameter (CEL+NaCl vs
194 SC560+NaCl: HPT U=29, p<0.001, PAG U=6, p=0). Statistical analysis also showed that the
195 induction of experimental inflammation with long-term exposure to celecoxib reduces the GLU
196 concentration in HI more than during exposure to SC560 (CEL+LPS vs SC560+LPS: HI U=37,
197 p=0.001). In contrast, the induction of experimental inflammation during chronic
198 administration of SC560 reduces the GLU concentration in the HPT more than during the
199 administration of celecoxib (CEL+LPS vs SC560+LPS: HPT U=0, p=0). It is noteworthy that
200 in HI, the induction of experimental inflammation during long-term administration of celecoxib
201 resulted in a decrease in GLU concentration (CEL+NaCl vs CEL+LPS: HI U=23, p<0.001).
202 Statistical analysis also showed that animals receiving SC560 without inflammation showed
203 lower GLU concentration in PAG than those who developed inflammation during long-lasting
204 treatment with this inhibitor (SC560+NaCl vs SC560+LPS: PAG U=41, p=0.002). The results
205 of intergroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for the
206 GLU concentration are presented in Tables 2-6. Graphically presented values of the discussed
207 variable are shown in Figure 4.

208 2.3. Glycine

209 We did not observe the influence of experimental inflammation on glycine (GLY) concentration
210 in any of the analyzed CNS structures (CNT + NaCl vs CNT + LPS). We observed that long-
211 lasting administration of celecoxib increased the GLY concentration within BS in animals
212 without (CNT+NaCl vs CEL+NaCl: BS U=0, p<0.001) and with experimentally induced
213 inflammation (CNT+LPS vs CEL+LPS: BS U=1, p<0.001). Chronic administration of SC560
214 increased the concentration of GLY in AM, BS, and HI in non-inflammatory animals
215 (CNT+NaCl vs SC560+NaCl: AM U=24, p=0.002, BS U=16, p=0.003, HI U=8, p<0.001) and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

216 in AM and BS of animals with experimentally induced inflammation (CNT+LPS vs
217 SC560+LPS: AM U=7, p<0.001, BS U=8, p<0.001). Interestingly, in the case of HPT, chronic
218 administration of SC560 causes a decrease in GLY concentration in animals without
219 (CNT+NaCl vs SC560+NaCl: HPT U=0, p<0.001) and with inflammation (CNT+LPS vs
220 SC560+LPS: HPT U=0, p<0.001). Long-lasting administration of SC560 compared to
221 celecoxib decreased GLY concentration in HPT of inflamed animals (CEL+LPS vs
222 SC560+LPS: HPT U=0, p=0). Administration of SC560 to animals without inflammation
223 resulted in higher GLY concentrations in HI than after administration of celecoxib (CEL+NaCl
224 vs SC560+NaCl: HI U=45, p=0.003). The results of intergroup comparisons using the Mann-
225 Whitney U test (with Bonferroni correction) for the GLY concentration are presented in Tables
226 2-6. Graphically presented values of the discussed variable are shown in Figure 5.

227 *2.4. Tyrosine*

228 The experimentally induced inflammation did no effect on the concentration of tyrosine (TYR)
229 in any of the examined CNS structures (CNT+NaCl vs CNT+LPS). We observed that long-
230 term administration of SC560 reduced the concentration of TYR in AM of non-inflamed
231 animals (CNT+NaCl vs SC560+NaCl: AM U=9, p<0.001) and in AM and HI in animals with
232 experimentally induced inflammation (CNT+LPS vs SC560+LPS: AM U=0, p<0.001, HI
233 U=17, p=0.004). We also observed the opposite effect, long-term administration of SC560
234 increased the concentration of TYR in HPT in non-inflamed animals (CNT+NaCl vs
235 SC560+NaCl: HPT U=6, p<0.001) and PAG in inflamed animals (CNT+LPS vs SC560+LPS:
236 PAG U=4, p<0.001). Comparing the effects of both inhibitors, we observed that administration
237 of SC560 led to a higher concentration of TYR in selected CNS structures. Higher
238 concentrations of TYR were observed in HPT in non-inflamed animals (CEL+NaCl vs
239 SC560+NaCl: HPT U=42, p=0.003) and in HI, HPT, and PAG in inflamed animals (CEL+LPS
240 vs SC560+LPS: HI U=30, p<0.001, HPT U=27, p<0.001, PAG U=39, p=0.003). The results of
241 intergroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for the
242 TYR concentration are presented in Tables 2-6. Graphically presented values of the discussed
243 variable are shown in Figure 6.

244 *2.5. GABA*

245 The performed statistical analysis showed no influence of the experimentally induced
246 inflammation on the concentration of gamma-aminobutyric acid (GABA) in any of the
247 examined CNS structures (CNT+NaCl vs CNT+LP). Chronic administration of celecoxib

248 increased GABA concentration in BS and PAG in animals without inflammation (CNT+NaCl
249 vs CEL+NaCl: BS U=6, p=0.005, PAG U=16, p=0.001) and in BS in animals with
250 experimentally induced inflammation (CNT+LPS vs CEL+LPS: BS U=17, p=0.004). We also
251 observed the opposite effect, in HPT of non-inflamed (CNT+NaCl vs CEL+NaCl: HPT U=16,
252 p<0.001) and in HI of inflamed animals (CNT+LPS vs CEL+LPS: HI U=1, p<0.001), chronic
253 administration of celecoxib lowered GABA concentration. In the case of SC560, statistical
254 analysis showed that its long-lasting administration increased GABA concentration in BS and
255 HI of non-inflamed animals (CNT+NaCl vs SC560+NaCl: BS U=8, p<0.001, HI U=0, p<0.001)
256 and AM of inflamed animals (CNT+LPS vs SC560+LPS: U=27, p<0.001). However, in HPT
257 in animals without (CNT+NaCl vs SC560+NaCl: HPT U=0, p<0.001) and with inflammation
258 (CNT+LPS vs SC560+LPS: HPT U=1, p<0.001), chronic administration of SC560 lowered
259 GABA concentration. Comparing the effects of celecoxib and SC560, we observed that long-
260 lasting administration of the second inhibitor resulted in a higher concentration of GABA in HI
261 of non-inflammatory (CEL+NaCl vs SC560+NaCl: HI U=0, p=0) and in AM and HI of
262 inflammatory animals (CEL+LPS vs SC560+LPS: AM U=27, p<0.001, HI U=18, p<0.001).
263 On the other hand, chronic administration of celecoxib led to higher GABA concentration in
264 PAG of non-inflamed animals (CEL+NaCl vs SC560+NaCl: PAG U=38, p=0.001) and in the
265 HPT of inflamed animals (CEL+LPS vs SC560+LPS: HPT U=14, p<0.001). Statistical analysis
266 also showed that induction of experimental inflammation in animals chronically administered
267 celecoxib led to a decrease in GABA concentration in HI (CEL+NaCl vs CEL+LPS: HI U=29,
268 p<0.001). The results of intergroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with
269 Bonferroni correction) for the GABA concentration are presented in Tables 2-6. Graphically
270 presented values of the discussed variable are shown in Figure 7.

271 2.6. Tryptophan

272 We did not observe the influence of experimental inflammation on tryptophan (TRP)
273 concentration in any examined CNT structures (CNT + NaCl vs CNT + LPS). We observed
274 that long-term administration of celecoxib reduced the concentration of TRP in the HPT of
275 animals without inflammation (CNT+NaCl vs CEL+NaCl: HPT U=12, p<0.001). The
276 statistical analysis showed that chronic administration of SC560 reduced the concentration of
277 TRP in the HPT of animals without inflammation (CNT+NaCl vs SC560+NaCl: HPT U=0,
278 p<0.001) and in the HI and HPT of animals with inflammation (CNT+LPS vs SC560+LPS: HI
279 U=16, p=0.003, HPT U=0, p<0.001). Comparing the effects of celecoxib and SC560, we
280 observed that long-lasting administration of the first inhibitor resulted in a higher concentration

281 of TRP in HI and HPT of inflamed animals (CEL+LPS vs SC560+LPS: HI U=31, p<0.001,
282 HPT U=0, p=0). Interestingly, induction of experimental inflammation in HPT in animals
283 chronically receiving celecoxib increased TRP levels (CEL+NaCl vs CEL+LPS: HPT U=39,
284 p=0.002). On the other hand, the use of the same experimental procedures resulted in a decrease
285 in the concentration of TRP in PAG (CEL+NaCl vs CEL+LPS: PAG U=12, p<0.001). LPS
286 injection during chronic inhibition of COX-1 activity led to a higher concentration of TRP in
287 the PAG of test animals than in the case of inhibition of COX-2 activity (CEL+LPS vs
288 SC560+LPS: PAG U=31, p<0.001). The results of intergroup comparisons using the Mann-
289 Whitney U test (with Bonferroni correction) for the TRP concentration are presented in Tables
290 2-6. Graphically presented values of the discussed variable are shown in Figure 8.

2.7. Results of plasma measurement

292 The effect of experimentally induced inflammation on the concentration of IL-1 β in the plasma
293 of animals was not observed (CNT+NaCl vs CNT+LPS: U=3, p=0.400). However, we noticed
294 that i.p. injection of LPS during chronic administration of SC560 increased the concentration
295 of IL-1 β in the plasma of the animals (SC560+NaCl vs SC560+LPS: U=5, p<0.001).

296 We observed a significant effect of experimental inflammation on tumor necrosis factor α
297 (TNF- α) concentration in control animals (CNT+NaCl vs CNT+LPS: U=0, p<0.005). Long-
298 lasting administration of SC560 lowered basal TNF- α levels in non-inflammatory animals
299 (CNT+NaCl vs SC560+NaCl: U=0, p<0.001). Comparing the effects of the tested inhibitors,
300 we observed that in non-inflammatory (CEL+NaCl vs SC560+NaCl: U=0, p=0) and inflamed
301 animals (CEL+LPS vs SC560+LPS: U=18, p<0.001), SC560 lowered TNF- α concentration
302 with greater potency. Interestingly, chronic administration of either celecoxib (CEL+NaCl vs
303 CEL+LPS: U=0, p=0) or SC560 (SC560+NaCl vs SC560+LPS: U=1, p=0) did not inhibit the
304 increase in plasma TNF- α concentration after i.p. LPS injection.

305 The results of intergroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with the Bonferroni
306 correction) for IL-1 β and TNF- α concentrations are presented in Table 7, while graphically
307 presented values of the discussed variables are presented in Figure 9.

3. Discussion

309 Many authors have discussed the effects of cyclooxygenase inhibitors on the
310 mammalian organism, but these studies have focused more on the periphery than the CNS. It is
311 known that ongoing inflammation affects the activity of neurotransmission systems mediated

312 by pro-inflammatory compounds, which include cytokines or prostaglandins, and in particular
1 313 PGE2 [LU et al. 2007]. During long-lasting therapy with cyclooxygenase inhibitors, the
2
3 314 inflammation is extinguished, but information about the action of these inhibitors on the CNS
4
5 315 does are still poor. We believe that due to the physiological role of cyclooxygenases in the CNS,
6
7 316 especially COX-2, the influence of such inhibitors may influence the homeostasis of
8
9 317 neurotransmitters [LÓPEZ and BALLAZ 2020]. Therefore, we performed a series of
10
11 318 experiments that allowed us to verify the assumption.

13 319 *3.1. Amygdala*

16 320 The amygdala (AM) is a complex, heterogeneous structure whose involvement in the
17
18 321 course of emotional processes is well known [PESSOA 2021]. It is responsible for identifying
19
20 322 the stimulus and determining the action that should be taken in response to its occurrence. It is
21
22 323 usually associated with negative emotions, e.g. fear conditioning, but it turns out that its activity
23
24 324 also affects positive emotions. Moreover, it mediates in making choices based on profit or loss
25
26 325 [RANGEL et al. 2008]. There is also evidence that AM plays a key role in focusing attention
27
28 326 [PESSOA 2021]. To sum up, coding the meaning or value of stimuli is crucial for the body to
29
30 327 undertake an appropriate physiological, behavioural, or emotional response [MORRISON and
31
32 328 SALZMAN 2010].

33 329 The amygdala receives projections from many cortical and subcortical areas. These
34
35 330 projections reach AM through various fiber bundles, including stria terminalis, ventral
36
37 331 amygdalofugal pathway, and the lateral olfactory bundle [ŠIMIĆ et al. 2021]. Glutamatergic
38
39 332 projections from various regions of the brain are initially directed to the lateral nucleus of the
40
41 333 amygdala. Then, NMDA and AMPA receptors are activated, which then affects the activity of
42
43 334 subsequent AM nuclei [ŠIMIĆ et al. 2021, SONG et al. 2017]. In our study, we did not observe
44
45 335 the effect of inhibition of COX-1 and COX-2 activity on the increase in the activity of the
46
47 336 glutamatergic system within AM. We observed, however, that inhibition of COX-2 activity, in
48
49 337 particular, increases the concentration of ASP within AM. Although the scientific literature
50
51 338 provides sufficient evidence that ASP is involved in the process of transmitting information
52
53 339 between neurons, calling it a neurotransmitter may still be controversial. Interestingly, ASP is
54
55 340 structurally similar to GLU and can selectively activate the NMDA receptor [DALANGIN et
56
57 341 al. 2020]. Some authors attribute a regulatory role to ASP over the glutamatergic system
58
59 342 [USIELLO et al. 2020]. Our data suggest that ASP rather than the classic excitatory
60
61
62
63
64
65

343 neurotransmitter GLU is responsible for the stimulation of AM activity in response to the
1 344 disruption of the COX-2-PGE2 pathway.
2
3

4 345 Interestingly, long-lasting blocking of COX-1 activity, also during inflammation,
5
6 346 decreased the concentration of TYR within AM. We suggest that this may be related to the
7
8 347 peripheral homeostatic function of COX-1 that has been inhibited by such administration of
9
10 348 SC560. As a result of the chronic use of SC560, internal organs may malfunction or even be
11
12 349 damaged. As a consequence, AM can induce a fear response for which monoamine resources
13
14 350 (adrenaline, norepinephrine, and dopamine) will be used. They are known to be responsible for
15
16 351 many emotional aspects in the mammalian CNS, so they can also be used for other purposes,
17
18 352 thereby depleting TYR resources [SMITH and PORRINO 2008]. We are aware that the
19
20 353 presented information requires additional research, therefore we propose to consider it as a kind
21
22 354 of hypothesis.

23 355 The experimental data on GABA concentration may appear to contradict the data on the
24
25 356 concentration of TYR (intensity of monoamine synthesis). We have shown that in response to
26
27 357 chronic inhibition of COX-1 activity, also during inflammation, the activity of the GABAergic
28
29 358 system in AM increases. We know that GABA is secreted by interneurons that mediate the
30
31 359 central part of the AM to attenuate the fear response. Moreover, such intra-structural
32
33 360 GABAergic activity influences the intensity of signaling in efferent pathways [ŠIMIĆ et al.
34
35 361 2021]. We suggest that the increased activity of the GABAergic system observed in this case
36
37 362 may constitute a defense mechanism. It seems that through it, the CNS could tone down the
38
39 363 excessive behavioural or emotional reaction that would arise in response to disturbance of the
40
41 364 homeostasis of internal organs or the humoral pathway of neuroimmune communication.

42 365 *3.2. Brainstem*

43
44

45 366 Brainstem (BS) is involved in the course of many essential life processes, which include:
46
47 367 the regulation of autonomic functions, regulation of sleep and consciousness, somatosensory
48
49 368 integration, and motor control [ROTHWELL and KOFLER 2012]. Our neurochemical analyzes
50
51 369 showed interesting relationships between the chronic inhibition of the COX-1/2-PGE2 pathway
52
53 370 and the increase in GLY concentration in BS under normal conditions and during inflammation.

54
55 371 Years ago, GLY was proven to act as a major neurotransmitter for inhibitory
56
57 372 interneurons in the spinal cord and BS. GLY was best known for regulating locomotor
58
59 373 behaviour, participating in the processing of motor information, and coordinating spinal
60
61 374 reflexes [WHEELER et al. 1999, DE BARTOLOMEIS et al. 2020]. However, with advances
62
63
64
65

375 in technology, it has been discovered that the bodies of glycinergic neurons (GLY
1 immunoreactive neurons) are located in circumventricular organs (CVOs) such as the area
2 376 postrema [RAMPON et al. 1996]. It is well known that CVOs are crucial for an efficient
3 377 neuroimmune communication process. These structures express receptors specific for pro-
4 378 inflammatory compounds, such as IL-1 β , and TNF- α , through which the signal is received and
5 379 then transmitted from the periphery to the CNS. [GANONG 2000, AKROUT et al. 2009]. Since
6 380 the blood-brain barrier (BBB) is disrupted within them, various compounds can enter or affect
7 381 the brain. Due to this feature, it is possible to control the feedback of secretion-releasing
8 382 hormone within the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) [GANONG 2000].
9 383 Interestingly, the area postrema receives direct visceral signals from the vagus nerve and is
10 384 bidirectionally linked to the nucleus tractus solitarii (NTS). Moreover, area postrema receives
11 385 the projection descending from HYP, more specifically from PVN [BENARROCH 2011].
12 386

13 387 In addition, neurons and glycinergic fibers were also located in the ambiguous nucleus
14 388 (AMb), which belongs to the nuclei of the vagus nerve, which is well known for its
15 389 immunomodulatory role [ZARBIN et al. 1981, RAMPON et al. 1996, EZURE 2003]. It is worth
16 390 noting that the activity of AMb neurons can activate the vagus nerve [MEI et al. 2008].
17 391 Subsequently, the excitation may be transferred to the body's periphery and the elements of the
18 392 lymphatic system may be affected [MEI et al. 2008]. An example of such a lymphoid organ is
19 393 the thymus, in which, as a result of electrical stimulation of AMb, there is an increase in
20 394 lymphocyte proliferation and the production of pro-inflammatory cytokines in response to
21 395 mitogen activation [NIIJIMA 1995, MEI et al. 2008].
22 396

23 397 It has been observed that neurochemical changes also affect the main inhibitory
24 398 neurotransmitter - GABA. Long-lasting inhibition of the activity of both COX isoforms (COX-
25 399 2 also during inflammation) enhanced the activity of the GABAergic system within the BS. It
26 400 is commonly known, that the central nucleus of the amygdala sends a GABAergic projection
27 401 to the brainstem. Increasing GABAergic transmission in this pathway may be associated with
28 402 the initiation of the fear response [URRUTIA-PIÑONES et al. 2022]. It seems that injections
29 403 of the compounds used caused the animals to experience stress, which could potentially respond
30 404 to it with a fear response.
31 405

32 406 At this point, it is worth mentioning the elements of neurophysiological puzzles, which
33 include: 1) chronic administration of COX-1/2 inhibitors increased GLY and GABA
34 concentration in BS; 2) there are glycinergic neurons in the area postrema and AMb; 3) both
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

407 the area postrema and AMb are structures involved in immunosensory or immunomodulatory
408 processes. Taking this into account, it can be assumed that in response to the disruption of one
409 of the neuroimmune communication pathways (humoral or neural), its function is taken over
410 by the efficient one that has remained functional. In this case, in response to the inhibition of
411 the COX-1/2-PGE2 pathway, we observed neurochemical changes within the structures
412 associated with vagal nerve activity. We assume that such a substantial disturbance of the
413 humoral pathway resulted in a particular increase in the activity of the neuronal pathway of
414 neuroimmune communication. Consequently, the body triggered the mechanisms responsible
415 for inhibiting the excessive activity of the neural pathway. This is confirmed by the increase in
416 GLY and GABA concentrations in the structures involved in the vagus nerve activity.

417 *3.3. Hippocampus*

418 The hippocampus (HI) is a complex structure located under the cerebral cortex. It plays
419 a key role in processes related to learning and the creation of memory engrams. As an element
420 of the limbic system, it can regulate the emotional behaviour of the animal [ORSINI et al. 2011].
421 It is possible due to its two-way connection with AM, which has a significant impact on this
422 process [ORSINI et al. 2011, YANG and WANG 2017]. Moreover, HI may indirectly influence
423 the activity of the peripheral immune system via the neuronal connections to HYP
424 [JACOBSON and SAPOLSKY 1991, ANAND and DHIKAV 2012]. It has been observed that
425 as a result of hippocampal atrophy and thus the abolition of its inhibitory function, the
426 concentration of plasma cortisol increases [ANAND and DHIKAV 2012].

427 The results of our experiment showed that long-lasting inhibition of COX-2 activity,
428 also during peripheral inflammation, increased in the concentration of ASP in the HI of the
429 animals. The same effect was also seen for the inhibition of COX-1 activity during peripheral
430 inflammation.

431 Disruption of the COX-1/2 pathway during peripheral inflammation resulted in
432 decreased activity of the glutamatergic system in HI. It is known that the analyzed structure
433 receives an ascending glutamatergic projection from entorhinal cortex [KHAKPAI et al. 2013].
434 Activation of the NMDA receptor or the metabotropic glutamate receptor from group 1 (mGluR)
435 in HI is responsible for many processes related to synaptic plasticity. They are: the formation
436 of short-term and long-term memory, aversive memory, memory enabling recognition of
437 objects, the phenomenon of long-term synaptic enhancement [MÉNARD and QUIRION 2012,
438 KHAKPAI et al. 2013]. Scientific literature reports that PGE2, via the EP3 receptor, has a

439 negative effect on HI-dependent memory processes [XIAO et al. 2018]. Moreover,
1 440 antagonizing the EP1 receptor for PGE2 in Huntington's disease has a positive effect on
2
3 441 memory processes [ANGLADA-HUGUET et al. 2014].
4
5

6 442 Our results show that chronic COX-1/2 inhibition is not able to completely block the
7
8 443 negative influence that PGE2 has on HI-dependent memory processes. In our experiment, we
9
10 444 presents evidence for this - a decrease in GLU concentration within HI. It is likely that the
11
12 445 decrease in GLU levels and the potentially associated disturbances may not be the sole effect
13
14 446 of PGE2. Of course, during peripheral inflammation, other molecules are also formed that
15
16 447 interact with HI.

17
18 448 We observed that inhibition of COX-1 activity increased the concentration of GLY
19
20 449 within HI. As we mentioned earlier that GLY acts rather as one of the major inhibitory
21
22 450 neurotransmitters, but within HI it may have the opposite effect [XU and GONG 2010, CHEN
23
24 451 et al. 2011]. Interestingly, the results of studies on the distribution of extrasynaptic receptors
25
26 452 for GLY provide information confirming the fact that they are present in all HI regions [XU
27
28 453 and GONG 2010, CHEN et al. 2011]. Moreover, they play an important role in cell excitability
29
30 454 and processes related to synaptic plasticity. Such an interaction may take place because GLY
31
32 455 may potentiate the effects induced by activation of NMDA receptors and thus affect LTP
33
34 456 [CHEN et al. 2011]. In addition, GLY can also indirectly stimulate the activity of HI neurons
35
36 457 by inhibiting the activity of the GABAergic system within them [XU and GONG 2010].

37 458 The experiment of SHANG et al. 2014 shows that COX-1 plays an important role in
38
39 459 reducing the cognitive deficits caused by damage to HI. In fact, they investigated the acute
40
41 460 effect of inhibition of COX-1 activity, but this resulted in an increase in the efficiency of
42
43 461 learning and memory [SHANG et al. 2014]. It is worth asking at this point whether the increase
44
45 462 in GLY concentration is responsible for the increased efficiency of the processes taking place
46
47 463 in HI?

48 464 Results of our study show that inhibition of COX-1 or COX-2 activity did not equally
49
50 465 affect the activity of the GABAergic system in HI. As is well known, HI involves processes
51
52 466 related to synaptic plasticity or the formation of neural circuits. Very many studies indicate a
53
54 467 significant influence of the GABAergic system on the development of connections between
55
56 468 neurons or even neurogenesis [PONTES et al. 2013, LI et al. 2020]. One of the factors
57
58 469 associated with cognitive decline is the impairment of the GABAergic system in HI. Higher
59
60 470 concentrations of GABA in HI are also manifested by better efficiency of processes related to
61
62
63
64
65

471 associative learning [YE et al. 2020]. Interestingly, ascribed in many publications also contain
1 472 information about influence of both COX isoforms on the functioning of HI. It has been shown
2
3 473 that inhibition or deficiency of COX-1 has a positive effect on neurogenesis, especially during
4
5 474 inflammation, which shows a negative effect [RUSSO et al. 2011]. On the other hand, inhibition
6
7 475 of COX-2 activity prevents synaptic reorganization and suppresses neurogenesis [ZHANG et
8
9 476 al. 2008].

11 477 In our study, we observed that long-term administration of SC560 causes an increase in
12
13 478 GABA levels within HI. In contrast, LPS challenge during long-lasting COX-1 inhibition led
14
15 479 to a significant reduction in GABA levels. Therefore, it can be assumed that the fluctuations in
16
17 480 GABA concentration will, to some extent, reflect the intensity of processes related to synaptic
18
19 481 plasticity, neurogenesis or cognitive processes. If we take GABA concentration as a partial
20
21 482 determinant of these processes, it shows us that chronic inhibition of COX-1 activity may have
22
23 483 a beneficial effect on the animal's HI function. However, peripheral inhibition of COX-1
24
25 484 activity is unable to block the adverse effects of inflammation on the GABAergic system within
26
27 485 HI.

28
29 486 In the case of inhibition of COX-2 activity under normal conditions and during
30
31 487 inflammation, we observed that the level of GABA within HI decreased. We believe that our
32
33 488 results can be considered as consistent with those reported by ZHANG et al. 2008. They showed
34
35 489 that administration of celecoxib negatively affects neurogenesis and reported that it also causes
36
37 490 an increase in the density of GABA-A receptors. Once again, it can be assumed that lowering
38
39 491 the GABA level in HI may constitute a potential neurochemical basis related to the disturbance
40
41 492 of this structure. On the other hand, a decrease in GABA concentration may be associated with
42
43 493 an increase in the density of GABA-A receptors, which could prevent their over-activation.
44
45 494 Obviously, additional experiments are necessary to solve this mystery, as the relationship
46
47 495 between the GABAergic system and the processes taking place in HI still requires a more
48
49 496 detailed understanding.

49
50 497 The present study showed that inhibition of COX-1 activity during peripheral
51
52 498 inflammation lowered the concentration of TRP in HI. This is probably related to the
53
54 499 indolamine 2,3-dioxygenase (IDO), which becomes activated by pro-inflammatory compounds
55
56 500 resulting from LPS injection [HÖGLUND et al. 2019]. Subsequently, the metabolism of TRP
57
58 501 enters the kinurein pathway, which may lead to a reduction in the concentration of 5-HT.
59
60 502 Moreover, low levels of 5-HT impair memory performance, the center of which is HI [HAIDER
61
62 503 et al. 2006, HÖGLUND et al. 2019]. This assumption is supported by the results of our previous

504 study on monoamine concentration during long-lasting inhibition of COX-1 activity. We have
1 505 observed that induction of experimental inflammation during such inhibition of COX-1 activity
2
3 506 reduces the level of 5-HT within HI [NAPORA et al. 2023].
4
5

6 507 *3.4. Hypothalamus*

7
8

9 508 The hypothalamus is a structure consisting of a group of nuclei located in the
10 509 diencephalon. It is a center that regulates: body temperature, activity of the autonomic nervous
11 510 system, appetite and body water management, interpersonal behaviour, circadian rhythm, the
12 511 work of hormonal glands and emotional behaviour [BEAR et al. 2018, SHAHID et al. 2018].
13
14 512 In this paper, however, we will focus on the participation of HPT in the course of
15
16 513 immunosensory processes (perception of a pyrogenic signal), immunomodulatory processes
17
18 514 (HPA axis) and those related to the induction of specific behaviours in the course of the disease
19
20 515 (induction of SB).
21
22
23

24 516 We observed that long-lasting inhibition of COX-1 or 2 activity, with and without
25
26 517 induction of experimental inflammation, decreased GLU levels in the HPT. It is believed that
27
28 518 the investigated neurotransmitter in the mediobasal part of HPT is responsible for the regulation
29
30 519 of the energy balance, which is directly related to food intake [GUYENET et al. 2013].
31 520 Experimental data presented by other authors confirms that inhibiting the activity of the
32
33 521 glutamatergic system through the use of NMDA receptor antagonists inhibits food intake
34
35 522 [DELGADO 2013]. Interestingly, during the course of the disease, SB induction may occur,
36
37 523 one of the characteristic components of which is a reduction in food intake [MAES et al. 2012].
38
39 524 It seems obvious that we could predict this effect after injecting LPS, but what about the
40
41 525 inhibition of COX-1 or 2 activity? We assume that long-lasting inhibition of the activity of both
42
43 526 COXs led to such disturbance of the homeostasis of internal organs (gastrointestinal tract, liver,
44
45 527 kidneys) that could be interpreted as a disease [BINDU et al. 2020]. Subsequently, some kind
46
47 528 of protective behaviour (SB-like behaviour) could be induced in the CNS of the animals, the
48
49 529 function of which could be to save energy and use it to fight the disease. Our attention was also
50
51 530 drawn to the fact that long-lasting use of SC560 decreased GLU concentration in HPT more
52
53 531 than celecoxib use, regardless of inflammation. For some time it was thought that COX-1, the
54
55 532 constitutive form, was responsible for maintaining the body's homeostasis. In contrast, the
56
57 533 induced form of COX-2 is active only during processes related to inflammation or
58
59 534 pathophysiological processes. It turns out, however, that both of them are responsible for
60
61 535 maintaining the state of internal equilibrium to a similar extent [ZIDAR et al. 2009]. These
62
63
64
65

536 results indicate that disrupted homeostasis due to chronic COX-1 inhibition is a stronger signal
1 537 for HPT than is the case with COX-2 inhibition.
2
3

4 538 Our results show that long-lasting disruption of COX-1 activity, regardless of
5
6 539 inflammation, leads to a reduction in GLY levels in HPT. The experiment of KROWICKI and
7
8 540 KAPUSTA 2011 shows that GLY (strychnine-sensitive glycine) receptors are found within
9
10 541 PVN, which would indicate a possible influence of the discussed molecule on HPT activity.
11
12 542 Nevertheless, glycine may attenuate hypothalamic vasopressin synthesis, which acts
13
14 543 synergistically with CRF at the level of pituitary. Therefore, the secretion of ACTH by the
15
16 544 pituitary gland may be weakened [HUSSY et al. 2001, CHOE et al. 2016].
17

18 545 The GLY level within HPT may also be related to circadian rhythm, specifically sleep
19
20 546 [KAWAI et al. 2015]. Data presented by others authors, shows that exogenously administered
21
22 547 GLY has a positive effect on sleep by lowering body temperature and vasodilating blood vessels
23
24 548 [BANNAI et al. 2012, KAWAI et al. 2015]. This is possible by acting on NMDA receptors in
25
26 549 the suprachiasmatic nucleus located in the HPT [BANNAI et al. 2012]. Once again, we would
27
28 550 like to refer to SB, another discussed component of which is sleepiness [MAES et al. 2012]. It
29
30 551 seems to us that long-term inhibition of COX-1 activity induced SB or SB-like behaviour with
31
32 552 the potential effect of reducing GLY levels within HPT. Then, as indicated in the literature,
33
34 553 sleepiness could occur as a consequence of such neurochemical change [YAMADERA et al.
35
36 554 2007, BANNAI et al. 2012, KAWAI et al. 2015].
37

38 555 Our results shows that long-lasting use of SC560 increases the level of TYR in HPT
39
40 556 regardless of inflammation. It has long been known that TYR is a precursor to catecholamines
41
42 557 in the CNS, including HPT. The effect of increasing TYR levels may be related to increased
43
44 558 synthesis and release of catecholamines [LIEBERMAN et al. 2015]. There is a group of neurons
45
46 559 in HPT that show the presence of tyrosine hydroxylase (TH), the enzyme responsible for
47
48 560 converting TYR to dihydroxyphenylalanine – dopamine precursor. TH-positive neurons belong
49
50 561 to the arcuate nucleus (ARC), which has connections with PVN. As a result of ARC stimulation,
51
52 562 PVN activity may be inhibited [ZHANG and VAN DEN POL 2016]. It seems that the
53
54 563 disturbance of the body's homeostasis caused by long-lasting inhibition of COX-1 activity has
55
56 564 left its mark on the initial element of the HPA axis. Since ARC inhibits PVN, potential changes
57
58 565 in ARC activity may result in changes in the HPA axis function. This information is rather
59
60 566 conjecture because the described relationship between catecholamines in ARC and PVN
61
62 activity has not yet been well studied.
63
64
65

568 The results of the neurochemical analysis showed that chronic inhibition of both COX
1 isoforms decreased GABA concentration in HPT. Results presented by others authors confirm
2 569 the fact that GABAergic neurons are found mainly in the lateral and dorsomedial HPT.
3 570 Moreover, they are also found in the previously described structure — ARC [SUYAMA and
4 571 YADA 2018]. The role of these GABAergic neurons is to regulate food intake. Exogenous
5 572 administration of GABA or its receptor agonists promotes food intake in animals [SUYAMA
6 573 and YADA 2018]. Because COX-1 and COX-2 inhibitors reduced the level of GABA in HPT,
7 574 we believe that with their chronic effect, the appetite decreases. We suppose that again we are
8 575 dealing with SB or SB-like symptoms that were induced by chronic use of COX inhibitors and
9 576 thus a violation of the peripheral homeostasis of the organism. Additionally, we have observed
10 577 that inhibiting COX-1 causes a greater reduction in GABA levels than inhibiting COX-2. So
11 578 again, we believe that chronic inhibition of COX-1 activity results in a more severe disruption
12 579 of the body's homeostasis.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 581 On the other hand, fluctuations recorded in the GABA level may be associated with the
25 582 perception of stress by the body [VERKUYL et al. 2005]. According to some researchers, stress
26 583 and the accompanying increase in glucocorticoid levels may inhibit GABAergic activity in
27 584 parvocellular PVN neurons. This would mean that the stress related to the disturbance of the
28 585 organism's homeostasis induced by the chronic administration of COX-1 or COX-2 indirectly
29 586 stimulates the HPA axis. Unfortunately, little is currently known about the mechanism that
30 587 could be responsible for this process [VERKUYL et al. 2005].
31
32
33
34
35
36
37

38 588 In response to long-lasting inhibition of both COX isoforms, TRP levels in the animals'
39 589 HPTs decreased. According to some authors, TRP metabolism in the CNS is significantly
40 590 related to the regulation of immunological processes [GOSTNER et al. 2020]. From our point
41 591 of view, changes in the level of TRP in the HPT are particularly important due to the influence
42 592 of the serotonergic system on the functioning of the HPA axis [SORGDRAGER et al. 2017].
43 593 As already mentioned, infections and the pro-inflammatory compounds formed during them
44 594 activate indoleamine 2,3-dioxygenase and change TRP metabolism towards the kynurenic
45 595 pathway [HÖGLUND et al. 2019]. However, we believe that IDO activity was attenuated (by
46 596 limiting the release of pro-inflammatory compounds by COX inhibitors), and we should rather
47 597 associate the decrease in TRP concentration with increased serotonin synthesis. Interestingly,
48 598 some researchers links abnormalities in the functioning of the HPA axis with dysregulation of
49 599 the serotonergic system [POMPILI et al. 2010].
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

600 The result that indicates the physiological role of both COX isoforms is noteworthy. It
1 has been observed that induction of experimental inflammation during chronic COX-1
2
3 602 inhibition reduces the level of TRP in HPT. However, the use of the same procedure during
4
5 603 chronic inhibition of COX-2 activity did not produce such an effect. This is confirmed by the
6
7 604 fact that COX-2 is rather an inducible isoform, which reaches its main peak of activity as a
8
9 605 result of unfavorable factors acting on the organism (e.g. tissue damage, pathogen invasion).
10
11 606 Probably, as a result of its chronic inhibition, there is not enough PGE2 and the accompanying
12
13 607 pro-inflammatory compounds to activate IDO and significantly affect the metabolism of TRP
14
15 608 in HPT. Of course, as we wrote earlier, COX-2 is also involved in the regulation of the proper
16
17 609 course of processes taking place in internal organs.

18 19 610 *3.5. Periaqueductal gray matter*

20
21 611 Periaqueductal gray matter (PAG) is a structure in the midbrain that is primarily known
22
23 612 to play a key role in the modulation of pain. Interestingly, PAG activity can lead to two
24
25 613 contradictory responses to pain - analgesic or nociceptive effects. Moreover, it also plays a
26
27 614 paramount role in regulating defensive and aversive behaviours by inducing autonomic and
28
29 615 emotional arousal. Therefore, it participates in the assessment of the risk that the body takes
30
31 616 when performing a specific activity [MOKHTAR and SINGH 2020].

32
33 617 It was observed that long-lasting administration of SC560 and induction of experimental
34
35 618 inflammation increased the concentration of ASP in PAG. As is known, PAG is rich in NMDA
36
37 619 receptors that can be activated by ASP [HU et al. 2009, DALANGIN et al. 2020].
38
39 620 Unfortunately, we still do not know enough facts that would allow us to precisely define the
40
41 621 role of the ASP within the PAG. Some authors attribute a regulatory role to this molecule with
42
43 622 the glutamatergic system [USIELLO et al. 2020].

44
45 623 The neurochemical analysis of the GLU level in PAG showed that long-lasting
46
47 624 inhibition of COX-1 activity decreased the value of the parameter studied. However,
48
49 625 performing the same procedure with the induction of experimental inflammation led to an
50
51 626 increase in the GLU level in the PAG. Interestingly, such inhibition of COX-2 leads to an
52
53 627 increase in GLU concentration in PAG compared to inhibition of COX-1. Because GLU within
54
55 628 PAG has different receptor subtypes, we are not able to clearly state whether the procedures
56
57 629 performed resulted in the strengthening or weakening of the pain transmission pathways. There
58
59 630 are several subtypes of metabotropic receptors for GLU (mGluRs) in PAG. Activation of its

631 subtypes 1 and 2 causes activation of the downstream antinociceptive pathways of PAG.
1
2 632 However, activation of subtype 3 receptors triggers the opposite effect [MAIONE et al. 2000].
3

4 633 Interestingly, an activation of mGluRs modulates social behaviour towards social
5
6 634 interaction and reduces aggression [ZOICAS and KORNHUBER 2019]. Referring to these
7
8 635 literature data, we can conclude that inhibition of COX-1 activity could weaken social
9
10 636 behaviour and increase aggression in animals, which would probably have a defensive function.
11
12 637 Based on this, we believe that inhibition of COX-2 activity should produce the opposite effects.
13
14 638 This is consistent with our previous study results in which we observed that inhibition of COX-
15
16 639 1 decreased locomotor activity, risk assessment, and increased anxiety. In contrast, inhibition
17
18 640 of COX-2 results in the opposite behaviour in rats [NAPORA et al. 2023]. Of course, we are
19
20 641 not saying that the whole of the observed behaviours is the result of changes in the
21
22 642 neurochemical activity of PAG only. We also showed that inhibition of the COX-1 isoform and
23
24 643 induction of experimental inflammation led to a higher GLU level in PAG. We combine this
25
26 644 with the fact that GLU-mediated descending pain-modulating pathways were activated in
27
28 645 response to inflammatory pain [LOYD and MURPHY 2009, MOKHTAR and SINGH 2020].

29 646 We observed that during long-lasting inhibition of COX-1 or COX-2 activity, the level
30
31 647 of TYR in PAG increases, in the case of isoform 2, even independently of inflammation. It is
32
33 648 noteworthy that inhibition of COX-1 leads to a higher increase in the level of TYR in PAG.
34

35 649 The site that is likely to be responsible for the changes in TYR levels is the ventrolateral
36
37 650 part of the PAG. There is a subpopulation of dopaminergic neurons that project, inter alia, to
38
39 651 AM, bed nucleus of stria terminalis (BNST) and locally within the PAG [MEYER et al. 2009].
40
41 652 Some researchers argue that this particular group of dopaminergic neurons is associated with
42
43 653 the regulation of pain behaviour [YU et al. 2021].
44

45 654 We believe that changes in TYR levels may be related to the effects of COX inhibitors
46
47 655 on catecholaminergic neurotransmission systems. In an earlier study, we showed that long-
48
49 656 lasting use of COX inhibitors affects the dopaminergic and noradrenergic systems, but in other
50
51 657 structures of the CNS [NAPORA et al. 2023]. Increasing the level of TRP indicates the
52
53 658 influence of the drugs used on the metabolism of catecholamines. Unfortunately, at this point,
54
55 659 we can only assume that the observed changes in TRP levels may affect the activity of PAG
56
57 660 and affect the behaviour of the animal.

58 661 We observed a higher level of GABA in PAG in response to long-lasting inhibition of
59
60 662 COX-2 activity. Interestingly, the use of the same procedure together with the induction of
61
62
63
64
65

663 experimental inflammation resulted in a decrease in GABA levels in PAG. Additionally, we
1 664 observed that the GABA level in PAG following chronic COX-2 inhibition was also higher
2
3 665 than that of COX-1 inhibition.
4

5
6 666 The levels of GABA and its metabolites throughout the PAG region are unevenly
7
8 667 distributed. The GABAergic neurons found in PAGs are mainly interneurons, which exert their
9
10 668 influence on the activity of the structure through internal neural circuits. GABA levels may
11
12 669 increase in this structure in response to stimuli harmful to the animal's organism [REICHLING
13
14 670 1991]. Interestingly, this increase in GABA levels affects the neurons that mediate
15
16 671 antinociception. The increase in GABAergic transmission in PAG after long-lasting inhibition
17
18 672 of COX-2 activity could be read as the CNS response to a noxious stimulus or disturbance of
19
20 673 the organism's homeostasis. On the other hand, it shows that chronic COX-2 inhibition in
21
22 674 addition to the peripheral analgesic effect can induce a compensatory mechanism for the
23
24 675 disruption of the "alarm system" of pain sensation.

25 676 We showed that in animals that were chronically treated with celecoxib and had
26
27 677 inflammation, we observed a decrease in PAG TRP levels. In contrast, chronic administration
28
29 678 of SC560 and induction of experimental inflammation lead to higher levels of TRP in PAG.
30
31 679 Interestingly, the lack of induction of experimental inflammation during long-term
32
33 680 administration of celecoxib increased PAG TRP levels.
34

35 681 *4. Experimental procedure*

36
37
38 682 Three-month-old male Wistar (Medical University of Bialystok, Poland) rats weighing
39
40 683 $250 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ (N = 78) were used for the experiment. The animals were individually housed in
41
42 684 rearing cages with food and water ad libitum. A 12-hour day/night cycle was set, and the light
43
44 685 was on from 7:00 am. The temperature range in the place of keeping the animals was from 21
45
46 686 to 22°C. Humidity in the place where the animals were kept was 60-65%. The animals were
47
48 687 habituated to the prevailing conditions for 7 days.

49 688 *4.1. Experimental groups and samples collecting*

50
51
52 689 For the purposes of the experiment, three main groups of animals were distinguished:
53
54 690 CNT, SC560 and CEL. For 10 days, each animal received daily subcutaneous (s.c.) injections
55
56 691 of 0.9% sodium chloride solution, celecoxib (10 mg/kg body weight) or SC560 (3 mg/kg body
57
58 692 weight) dissolved in 100 μl 0.9% NaCl. Then, on the 11th day of the experiment, half of the
59
60 693 randomly selected animals received a single intraperitoneal injection with 10 μg of
61
62
63
64
65

694 lipopolysaccharide (LPS, Escherichia coli 026:B6) dissolved in 100 µl of 0.9% NaCl
695 (CNT+LPS, CEL+ LPS, SC560+LPS). The remaining experimental animals received only
696 0.9% NaCl solution in the same volume (CNT+NaCl; CEL+NaCl; SC560+NaCl). The effects
697 of intergroup comparisons and the effects studied on their basis are presented in Table 1.

698 The animals used for the biochemical analysis were decapitated 125 minutes after the
699 intraperitoneal injection. After the animals were euthanized, blood was collected from the torso.
700 The amygdala, brainstem, hippocampus, hypothalamus, and periaqueductal gray matter were
701 also collected from each of the animals. The experimental procedures to which the animals
702 were subjected are shown in Figure 2. Each collected structure was weighed and then
703 homogenized using an ultrasonic homogenizer (BioBlock Scientific) for 15 seconds in 150 µl
704 in a homogenization solution (0.4 mM Na₂S₂O₅, 0.6 mM HClO₄). 200 µl of homogenization
705 solution was used to homogenize BS. The homogenate was centrifuged at 12.000 rpm for 15
706 min at 4°C. After performing the above-mentioned procedures, at least 100 µl of homogenates
707 of each structure were taken and then placed in chromatography tubes and stored at -72°C.
708 Plasma was obtained by centrifugation of previously drawn blood in ethylenediaminetetraacetic
709 acid (EDTA) (1 ml/100 µl Na₂EDTA); at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C. The obtained plasma
710 was stored under the same conditions as the homogenates of the CNS structures.

711 *4.2. Biochemical analysis of plasma*

712 Plasma compounds interleukin 1β (IL-1β) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were
713 determined using the HUMAN IL-1β ELISA kit and the HUMAN TNF-α ELISA kit according
714 to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

715 *4.3. Chromatographic analysis of amino acids*

716 The RP-HPLC-ED gradient method with pre-column derivatization using the OPT-thiol
717 reagent (0.1 M borax, 0.5% OPT, 0.9% mercaptoethanol) was used to determine the
718 concentration of amino acids: aspartate (ASP), glutamate (GLU), glycine (GLY), tyrosine
719 (TYR), gamma-aminobutyric acid (GABA) and tryptophan (TRP). An Agilent 110
720 chromatography system with a Waters, AccQ-Tag chromatography column was used to analyze
721 the amino acid concentration. The column temperature was set to 37°C and the mobile phase
722 flow to 0.4 ml/min. The carbon working electrode was set to + 0.5 V relative to the AG/AgCl
723 reference electrode. Gradient elution was carried out using a phosphate buffer (pH 5.5)
724 containing 0.05 M NaH₂PO₄ x H₂O, with the addition of methanol; in buffers A (20%) and B

725 (80%). Initially, the mobile phase contained 100% of buffer A. Subsequently, within 10
726 minutes, the concentration of buffer B increased to 10%, so the mobile phase consisted of 90%
727 A and 10% B. Then, over the next 30 minutes, it increased to 85%, so the mobile phase
728 consisted of 15% A and 85% B. Finally, the content of buffer B was reduced to 0%, so the
729 mobile phase consisted only of buffer A. After analysis, the system was equilibrated for 10
730 minutes for each sample. The obtained chromatographic data were analyzed using the
731 ChemStation, Revision-B.03.02, Agilent software.

732 *4.4. Statistical analysis of data*

733 When planning the experiment, we assumed that the multivariate analysis of variance
734 test (MANOVA) would be used for the statistical analysis. However, the Shaphiro-Wilk test
735 showed that not all biochemical data meet the criteria for applying the parametric test (the data
736 was not normally distributed). The applied transformations aimed at obtaining a normal
737 distribution (Box-Cox transformation, natural logarithm, decimal logarithm, and square root)
738 did not allow for the application of the parametric test. Therefore, the Mann-Whitney U test
739 with the Bonferroni correction was used, and the p value for the analyzed data was set at 0.006
740 ($0.05 \div 9 \approx 0.006$).

741 *5. Figures and tables description*

742 *5.1. Figures*

743 Figure 1. Graphical abstract. sc. – subcutaneous, ip. Intraperitoneal, LPS – lipopolysaccharide, CEL – celecoxib,
744 HI – hippocampus, AM – amygdala, HPT – hypothalamus, PAG – periaqueductal gray matter, BS – brainstem,
745 ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY – glycine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TYR – tyrosine, TRP –
746 tryptophan, ↑ – concentration increase, ↓ – concentration decrease.

747 Figure 2. Experimental procedures shown in the timeline. s.c. – subcutaneous, i.p. Intraperitoneal, LPS –
748 lipopolysaccharide, COX – cyclooxygenase, NaCl – 0.9% saline solution.

749 Figure 3. The concentration of aspartate in selected brain structures. CNT – group of animals receiving long-term
750 subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single
751 intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL - group of animals receiving long-term subcutaneously
752 celecoxib, SC560 - group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib.

753 Figure 4. The concentration of glutamate in selected brain structures. CNT – group of animals receiving long-term
754 subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single
755 intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL - group of animals receiving long-term subcutaneously
756 celecoxib, SC560 - group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib.

757 Figure 5. The concentration of glycine in selected brain structures. CNT – group of animals receiving long-term
1 758 subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single
2
3 759 intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously
4 760 celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib.
5

6 761 Figure 6. The concentration of tyrosine in selected brain structures. CNT – group of animals receiving long-term
7
8 762 subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single
9
10 763 intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously
11 764 celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib.
12

13 765 Figure 7. The concentration of GABA in selected brain structures. CNT – group of animals receiving long-term
14
15 766 subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single
16 767 intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously
17 768 celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib.
18
19

20 769 Figure 8. The concentration of tryptophan in selected brain structures. CNT – group of animals receiving long-
21
22 770 term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS –
23 771 single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously
24 772 celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib.
25
26

27 773 Figure 9. The concentration of selected cytokines in rat plasma. $IL-1\beta$ – interleukin 1β , $TNF-\alpha$ – tumor necrosis
28 774 factor α , CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single
29
30 775 intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL –
31 776 group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term
32
33 777 subcutaneously celecoxib.
34

35 778 5.2. Tables

36
37

38 779 Table 1. Table 1. Description of the comparisons and the effects studied on their basis. CNT – group of animals
39
40 780 receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline
41 781 solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term
42
43 782 subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib.
44

45 783 Table 2. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for
46
47 784 the concentration of selected amino acids [ng/g] in the amygdala. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY –
48 785 glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals
49
50 786 receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline
51 787 solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term
52
53 788 subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.
54

55 789 Table 3. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for
56
57 790 the concentration of selected amino acids [ng/g] in the brainstem. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY –
58 791 glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals
59 792 receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline
60
61
62
63
64
65

793 solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term
1 794 subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

3 795 Table 4. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for
4 796 the concentration of selected amino acids [ng/g] in the hippocampus. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY –
5 797 glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals
6 798 receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline
7 799 solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term
8 800 subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

13 801 Table 5. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for
14 802 the concentration of selected amino acids [ng/g] in the hypothalamus. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY –
15 803 glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals
16 804 receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline
17 805 solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term
18 806 subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

23 807 Table 6. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for
24 808 the concentration of selected amino acids [ng/g] in the periaqueductal gray matter. ASP – aspartate, GLU –
25 809 glutamate, GLY – glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group
26 810 of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of
27 811 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving
28 812 long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

33 813 Table 7. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for
34 814 the concentration of selected compounds [pg/ml] in animal plasma. Il-1 β – interleukin 1 β , TNF- α – tumor necrosis
35 815 factor α , CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single
36 816 intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL –
37 817 group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term
38 818 subcutaneously SC560.

43 819 *Acknowledgements*

46 820 Authors contribution

48 821 **PN** wrote the manuscript, designed the figures, reviewed the literature, performed statistical
49 822 analyses, and interpreted the results.

53 823 **AK** made corrections to the manuscript and figures, assisted in the statistical analysis of the
54 824 results

57 825 **KPK** obtained the results of the concentration of pro-inflammatory compounds in the plasma
58 826 of the animals.

827 MW designed the experiment, performed the experimental procedures on living animals,
828 and collected the samples.

829 *Additional information*

830 The authors confirm that there is no conflict of interest.

831 The applied experimental procedures were performed with the consent of the Local Ethical
832 Committee, 73/ŁB582/2012.

833 This work was supported by the Polish National Science Center
834 (NCN, UMO 2012/07/B/NZ4/00205)

835 *References*

836 AGARD, M., ASAKRAH, S., MORICI, L. A. (2013). PGE2 suppression of innate immunity
837 during mucosal bacterial infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 3(45), 1-
838 36. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00045>

839 AKROUT N., SHARSHAR T., ANNANE D. (2009). Mechanisms of brain signaling during
840 sepsis. *Current Neuropharmacology*. 7(4), 296-301.
841 <https://doi.org/10.2174/157015909790031175>

842 ANAND, K. S., DHIKAV, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An
843 overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 15(4), 239–246.
844 <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>

845 ANDREASSON, K. (2010). Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological
846 disease. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 91(3-4), 104-112.
847 <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.04.003>

848 ANGLADA-HUGUET, M., XIFRÓ, X., GIRALT, A., ZAMORA-MORATALLA, A.,
849 MARTÍN, E. D., ALBERCH, J. (2014). Prostaglandin E2 EP1 Receptor Antagonist Improves
850 Motor Deficits and Rescues Memory Decline in R6/1 Mouse Model of Huntington's Disease.
851 *Molecular Neurobiology*. 49, 784–795. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8556-x>

852 BANNAI, M., KAWAI, N., ONO, K., NAKAHARA, K., MURAKAMI, N. (2012). The effects
853 of glycine on subjective daytime performance in partially sleep-restricted healthy
854 volunteers. *Frontiers in Neurology*. 3(61), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00061>

855 BEAR, M. H., REDDY, V., BOLLU, P. C., Neuroanatomy, Hypothalamus. [Updated 2021 Oct
856 14]. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.

857 BENARROCH, E. E., (2011). Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions
858 and clinical implications. *Neurology*. 77(12), 1198-1204.
859 <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31822f04a0>

860 BINDU, S., MAZUMDER, S., BANDYOPADHYAY, U. (2020). Non-steroidal anti-
861 inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical*
862 *Pharmacology*. 180, 1-81. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>

863 BLOMQVIST, A., ENGBLOM, D. (2018). Neural mechanisms of inflammation-induced
864 fever. *The Neuroscientist*. 24(4), 381-399. <https://doi.org/10.1177/1073858418760481>

865 CHEN, R. Q., WANG, S. H., YAO, W., WANG, J. J., JI, F., YAN, J. Z., REN, S. Q., CHEN,
1 866 Z., LIU, S. Y., LU, W. (2011). Role of Glycine Receptors in Glycine-Induced LTD in
2 867 Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Neuropsychopharmacology*. 36, 1948–1958.
3 868 <https://doi.org/10.1038/npp.2011.86>
4
5 869 CHOE, K. Y., TRUDEL, E., BOURQUE, C. W. (2016). Effects of salt loading on the regulation
6 870 of rat hypothalamic magnocellular neurosecretory cells by ionotropic GABA and glycine
7 871 receptors. *Journal of Neuroendocrinology*. 28, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jne.12372>
8
9 872 CLASADONTE, J., POULAIN, P., HANCHATE, N. K., CORFAS, G., OJEDA, S. R.,
10 873 PREVOT, V. (2011). Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing
11 874 hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proceedings of the National*
12 875 *Academy of Sciences*. 108(38), 16104-16109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107533108>
13
14 876 CRYER, B., BARNETT, M. A., WAGNER, J., WILCOX, C. M. (2016). Overuse and
15 877 misperceptions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the United States. *The American*
16 878 *Journal of the Medical Sciences*. 352(5), 472-480.
17 879 <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.08.028>
18
19 880 DALANGIN, R., KIM, A., CAMPBELL, R. E. (2020). The role of amino acids in
20 881 neurotransmission and fluorescent tools for their detection. *International Journal of Molecular*
21 882 *Sciences*. 21(17), 1-81. <https://doi.org/10.3390/ijms21176197>
22
23 883 DANTZER, R., O'CONNOR, J. C., FREUND, G. G., JOHNSON, R. W., KELLEY, K. W.
24 884 (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates
25 885 the brain. *Nature reviews neuroscience*. 9(1), 46-56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
26
27 886 DE BARTOLOMEIS, A., MANCHIA, M., MARMO, F., VELLUCCI, L., IASEVOLI, F.,
28 887 BARONE, A. (2020). Glycine signaling in the framework of dopamine-glutamate interaction
29 888 and postsynaptic density. Implications for treatment-resistant schizophrenia. *Frontiers in*
30 889 *Psychiatry*. 11, 1-69. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00369>
31
32 890 DELGADO, T. C. (2013). Glutamate and GABA in Appetite Regulation. *Frontiers in*
33 891 *Endocrinology*. 4, 1-28. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00103>
34
35 892 ELANDER, L., ENGSTRÖM, L., RUUD, J., MACKERLOVA, L., JAKOBSSON, P. J.,
36 893 ENGBLOM, D., NILSBERTH C., BLOMQVIST, A. (2009). Inducible prostaglandin E2
37 894 synthesis interacts in a temporally supplementary sequence with constitutive prostaglandin-
38 895 synthesizing enzymes in creating the hypothalamic–pituitary–adrenal axis response to immune
39 896 challenge. *Journal of Neuroscience*. 29(5), 1404-1413. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5247-08.2009>
40
41 897
42 898 EZURE, K., TANAKA, I., KONDO, M. (2003). Glycine is used as a transmitter by
43 899 decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *Journal of*
44 900 *Neuroscience*. 23(26), 8941-8948. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-26-08941.2003>
45
46 901 FERNSTROM, J. D., FERNSTROM, M. H. (2007). Tyrosine, phenylalanine, and
47 902 catecholamine synthesis and function in the brain. *The Journal of Nutrition*. 137(6), 1539-1547.
48 903 <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1539S>
49
50 904 GANONG, W. F. (2000). Circumventricular organs: definition and role in the regulation of
51 905 endocrine and autonomic function. *Clinical and Experimental Pharmacology and*
52 906 *Physiology*. 27(5- 6), 422-427. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03259.x>
53
54 907 GOSTNER, J. M., GEISLER, S., STONIG, M., MAIR, L., SPERNER-UNTERWEGER, B.,
55 908 FUCHS, D. (2020). Tryptophan metabolism and related pathways in psychoneuroimmunology:
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

909 the impact of nutrition and lifestyle. *Neuropsychobiology*. 79(1-2), 89-99.
1 910 <https://doi.org/10.1159/000496293>
2
3 911 GRAHAM, S. H., HICKEY, R. W. (2003). Cyclooxygenases in central nervous system
4 912 diseases: a special role for cyclooxygenase 2 in neuronal cell death. *Archives of*
5 913 *Neurology*. 60(4), 628-630. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.4.628>
6
7 914 GUYENET, S. J., MATSEN, M. E., MORTON, G. J., KAIYALA, K. J., SCHWARTZ, M. W.
8 915 (2013). Rapid glutamate release in the mediobasal hypothalamus accompanies feeding and is
9 916 exaggerated by an obesogenic food. *Molecular Metabolism*. 2(2), 116–122.
10 917 <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.02.001>
11
12 918 HAIDER, S., KHALIQ, S., AHMED, S. P., HALEEM, D. J. (2006). Long-term tryptophan
13 919 administration enhances cognitive performance and increases 5HT metabolism in the
14 920 hippocampus of female rats. *Amino Acids*. 31(4), 421-425. [https://doi.org/10.1007/s00726-005-](https://doi.org/10.1007/s00726-005-0310-x)
15 921 [0310-x](https://doi.org/10.1007/s00726-005-0310-x)
16
17 922 HILLIER, K., TEMPLETON, W. W. (1980). Regulation of noradrenaline overflow in rat
18 923 cerebral cortex by prostaglandin E2. *British Journal of Pharmacology*. 70(3), 469-473.
19 924 <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1980.tb08725.x>
20
21 925 HÖGLUND, E., ØVERLI, Ø., WINBERG, S. (2019). Tryptophan metabolic pathways and
22 926 brain serotonergic activity: a comparative review. *Frontiers in endocrinology*, 10(158), 1-28.
23 927 <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00158>
24
25 928 HU, J., WANG, Z., GUO, Y. Y., ZHANG, X. N., XU, Z. H., LIU, S. B., GUO, H. J., YANG,
26 929 Q., ZHANG, F. X., SUN X. L., ZHAO, M. G. (2009). A role of periaqueductal grey NR2B-
27 930 containing NMDA receptor in mediating persistent inflammatory pain. *Molecular Pain*. 5(71),
28 931 1-23. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-71>
29
30 932 HUANG, D., ZHANG, L. U., YANG, J. Q., LUO, Y., CUI, T., DU, T. T., JIANG, X. H. (2019).
31 933 Evaluation on monoamine neurotransmitters changes in depression rats given with sertraline,
32 934 meloxicam or/and caffeic acid. *Genes & Diseases*. 6(2), 167-175.
33 935 <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.005>
34
35 936 HUSSY, N., BRÈS, V., ROCHETTE, M., DUVOID, A., ALONSO, G., DAYANITHI, G.
36 937 MOOS, F. (2001). Osmoregulation of vasopressin secretion via activation of neurohypophysial
37 938 nerve terminals glycine receptors by glial taurine. *Journal of Neuroscience*. 21(18) 7110–7116.
38 939 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07110.2001>
39
40 940 JACOBSON, L., SAPOLSKY, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation
41 941 of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine reviews*. 12(2), 118-134.
42 942 <https://doi.org/10.1210/edrv-12-2-118>
43
44 943 KALINSKI P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *The Journal of*
45 944 *Immunology*. 188(1), 1-34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>
46
47 945 KAWABATA A. (2011). Prostaglandin E2 and pain—an update. *Biological and*
48 946 *Pharmaceutical Bulletin*. 34(8), 1170-1173. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1170>
49
50 947 KAWAI, N., SAKAI, N., OKURO, M., KARAKAWA, S., TSUNEYOSHI, Y., KAWASAKI,
51 948 N., TAKEDA, T., BANNAI, M., NISHINO, S. (2015). The sleep-promoting and hypothermic
52 949 effects of glycine are mediated by NMDA receptors in the suprachiasmatic
53 950 nucleus. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of*
54 951 *Neuropsychopharmacology*. 40(6), 1405-1416. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.326>
55
56 952 KHAKPAI, F., ZARRINDAST, M. R., NASEHI, M., HAERI-ROHANI, A., EIDI, A. (2013).
57 953 The role of glutamatergic pathway between septum and hippocampus in the memory
58
59
60
61
62
63
64
65

954 formation. *Experimental and Clinical Journal*. 12, 41-51. <https://doi.org/10.17877/DE290R-5594>

955

956 KITAOKA, S., FURUYASHIKI, T., NISHI, A., SHUTO, T., KOYASU, S., MATSUOKA, T.,
957 MIYASAKA, M., GREENGARD, P., NARUMIYA, S. (2007). Prostaglandin E2 acts on EP1
958 receptor and amplifies both dopamine D1 and D2 receptor signaling in the striatum. *Journal of*
959 *Neuroscience*. 27(47), 12900-12907. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-07.2007>

960 KROWICKI, Z. K., KAPUSTA, D. R. (2011). Microinjection of glycine into the hypothalamic
961 paraventricular nucleus produces diuresis, natriuresis, and inhibition of central sympathetic
962 outflow. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 337(1), 247–255.
963 <https://doi.org/10.1124/jpet.110.175398>

964 LI, J., CHEN, L., GUO, F., HAN, X. (2020). The effects of GABAergic system under cerebral
965 ischemia: Spotlight on cognitive function. *Neural Plasticity*. 2020, 1-9.
966 <https://doi.org/10.1155/2020/8856722>

967 LIEBERMAN, H. R., THOMPSON, L. A., CARUSO, C. M., NIRO, P. J., MAHONEY, C. R.,
968 MCCLUNG, J. P., CARON, G. R. (2015). The catecholamine neurotransmitter precursor
969 tyrosine increases anger during exposure to severe psychological
970 stress. *Psychopharmacology*. 232, 943-951. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3727-7>.

971 LÓPEZ, D. E., BALLAZ, S. J. (2020). The role of brain cyclooxygenase-2 (Cox-2) beyond
972 neuroinflammation: Neuronal homeostasis in memory and anxiety. *Molecular*
973 *Neurobiology*. 57(12), 5167-5176. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02087-x>

974 LOYD, D. R., MURPHY, A. Z. (2009). The role of the periaqueductal gray in the modulation
975 of pain in males and females: are the anatomy and physiology really that different?. *Neural*
976 *plasticity*. 2009, 1-31. <https://doi.org/10.1155/2009/462879>

977 LU, J., XING, J., LI, J. (2007). Prostaglandin E2 (PGE2) inhibits glutamatergic synaptic
978 transmission in dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG). *Brain Research*. 1162, 38-47.
979 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.004>

980 LV, L., BAI, D., MA, Y., LIU, K., MA, Y. (2021). The PGE2 receptor EP3 plays a positive
981 role in the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activity in the
982 hypothalamus under immobilization stress. *Brain Research Bulletin*. 168, 45-51.
983 <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.12.014>

984 MAES, M., BERK, M., GOEHLER, L., SONG, C., ANDERSON, G., GAŁECKI, P.,
985 LEONARD, B. (2012). Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared
986 inflammatory pathways. *BioMed Central Medicine*. 10(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-66>

987

988 MAIONE, S., MARABESE, I., OLIVA, P., DE NOVELLIS, V., STELLA, L., ROSSI, F.,
989 FILIPPELLI, A., ROSSI, F. Periaqueductal gray matter glutamate and GABA decrease
990 following subcutaneous formalin injection in rat. *Neuroreport*. 10(7), 1403-1407.
991 <https://doi.org/10.1097/00001756-199905140-00004>

992 MEDEIROS, A., PERES-BUZALAF, C., VERDAN, F. F., SEREZANI, C. H. (2012).
993 Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different
994 organs. *Mediators of Inflammation*. 2012, 1-37. <https://doi.org/10.1155/2012/327568>

995 MEI, Y. W., YANG, Z. Q., WANG, W., SONG, D. G., DENG, X. M., LIU, J. X. (2008). Acute
996 electrical stimulation of nucleus ambiguus enhances immune function in rats. *Canadian*
997 *Journal of Neurological Sciences*. 35(4), 441-447.
998 <https://doi.org/10.1017/s0317167100009094>

- 999 MÉNARD, C., QUIRION, R. (2012). Group 1 metabotropic glutamate receptor function and
1000 its regulation of learning and memory in the aging brain. *Frontiers in Pharmacology*. 3(182) 1-
1001 42. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00182>
- 1002 MEYER, P. J., MORGAN, M. M., KOZELL, L. B., INGRAM, S. L. (2009). Contribution of
1003 dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated
1004 antinociception. *Psychopharmacology*. 204(3), 531-540.
1005 <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1482-y>
- 1006 MORRISON, S. E., SALZMAN, C. D. (2010). Re-valuing the amygdala. *Current Opinion in*
1007 *Neurobiology*. 20(2), 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.02.007>
- 1008 MOKHTAR, M., SINGH, P. (2020). Neuroanatomy, Periaqueductal Gray. [Updated 2020 Jul
1009 31]. *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-.
- 1010 NAPORA, P., KOBRZYCKA, A., PIERZCHAŁA-KOZIEC, K., WIECZOREK, M. (2023).
1011 Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems
1012 of the rat brain. *Behavioural Brain Research*. 438, 114143.
1013 <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114143>
- 1014 NIIJIMA, A. (1995). An electrophysiological study on the vagal innervation of the thymus in
1015 the rat. *Brain Research Bulletin*. 38(4), 319-323. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(95\)00103-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00103-1)
- 1016 OOTSUKA, Y., BLESSING, W. W., STEINER, A. A., ROMANOVSKY, A. A. (2008). Fever
1017 response to intravenous prostaglandin E2 is mediated by the brain but does not require afferent
1018 vagal signaling. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative*
1019 *Physiology*. 294(4), 1294-1303. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00709.2007>
- 1020 ORSINI, C. A., KIM, J. H., KNAPSKA, E., MAREN, S. (2011). Hippocampal and prefrontal
1021 projections to the basal amygdala mediate contextual regulation of fear after extinction. *Journal*
1022 *of Neuroscience*. 31(47), 17269-17277. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4095-11.2011>
- 1023 PECCHI, E., DALLAPORTA, M., JEAN, A., THIRION, S., TROADEC, J. D. (2009).
1024 Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiology & Behavior*. 97, 279-
1025 292. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.040>
- 1026 PESSOA, L. (2011). Reprint of: Emotion and cognition and the amygdala: From “what is it?”
1027 to “what's to be done?”. *Neuropsychologia*. 49(4), 681-694.
1028 <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2011.02.030>
- 1029 POMPILI, M., SERAFINI, G., INNAMORATI, M., MÖLLER-LEIMKÜHLER, A. M.,
1030 GIUPPONI, G., GIRARDI, P., TATARELLI R., LESTER, D. (2010). The hypothalamic-
1031 pituitary-adrenal axis and serotonin abnormalities: a selective overview for the implications of
1032 suicide prevention. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 260(8), 583-
1033 600. <https://doi.org/10.1007/s00406-010-0108-z>
- 1034 PONTES, A., ZHANG, Y., HU, W. (2013). Novel functions of GABA signaling in adult
1035 neurogenesis. *Frontiers in Biology*. 8(5), 1-19. <https://doi.org/10.1007/s11515-013-1270-2>
- 1036 RAMPON, C., LUPPI, P. H., FORT, P., PEYRON, C., JOUVET, M. (1996). Distribution of
1037 glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience*. 75(3), 737-755.
1038 [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00278-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00278-3)
- 1039 RANGEL, A., CAMERER, C., MONTAGUE, P. R. (2008). Neuroeconomics: The
1040 neurobiology of value-based decision-making. *Nature Reviews. Neuroscience*. 9(7), 545-556.
1041 <https://doi.org/10.1038/nrn2357>

- 1043 REICHLING, D. B. GABAergic neuronal circuitry in the periaqueductal gray matter. In *The*
1044 *midbrain periaqueductal gray matter* (pp. 329-344). Springer. Boston. 1991. 329-344.
1045 https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3302-3_18
1046 ROTHWELL, J., KOFLER, M. (2012). Neurophysiology of the brainstem-structure and
1047 function of brainstem circuits. *Clinical Neurophysiology*. 1(123), 2-3.
1048 <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.10.008>
1049 RUSSO, I., AMORNPHIMOLTHAM, P., WEIGERT, R., BARLATI, S., BOSETTI, F. (2011).
1050 Cyclooxygenase-1 is involved in the inhibition of hippocampal neurogenesis after
1051 lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. *Cell cycle*. 10(15), 2568–2573.
1052 <https://doi.org/10.4161/cc.10.15.15946>
1053 SHAHID, Z., ASUKA, E., SINGH, G. Physiology, Hypothalamus. [Updated 2022 May 8]. In:
1054 *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-*
1055 SHANG, J. L., CHENG, Q., YANG, W. F., ZHANG, M., CUI, Y., & WANG, Y. F. (2014).
1056 Possible roles of COX-1 in learning and memory impairment induced by traumatic brain injury
1057 in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 47, 1050-1056.
1058 <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143601>
1059 SINGH, A. K., ZAJDEL, J., MIRRASEKHIAN, E., ALMOOSAWI, N., FRISCH, I.,
1060 KLAWONN, A. M., JAAROLA, M., FRITZ, M., ENGBLOM, D. (2017). Prostaglandin-
1061 mediated inhibition of serotonin signaling controls the affective component of inflammatory
1062 pain. *The Journal of Clinical Investigation*. 127(4), 1370-1374.
1063 <https://doi.org/10.1172/JCI90678>
1064 SMITH, H. R., PORRINO, L. J. (2008). The comparative distributions of the monoamine
1065 transporters in the rodent, monkey, and human amygdala. *Brain Structure and*
1066 *Function*. 213(1), 73-91. <https://doi.org/10.1007/s00429-008-0176-2>
1067 SONG, C., ZHANG, W. H., WANG, X. H., ZHANG, J. Y., TIAN, X. L., YIN, X. P., PAN, B.
1068 X. (2017). Acute stress enhances the glutamatergic transmission onto basoamygdala neurons
1069 embedded in distinct microcircuits. *Molecular Brain*. 10(1), 1-10.
1070 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.077>
1071 SORGDRAGER, F. J. H., DOORNBOS, B., PENNINX, B. W. J. H., DE JONGE, P., KEMA,
1072 I. P. (2017). The association between the hypothalamic pituitary adrenal axis and tryptophan
1073 metabolism in persons with recurrent major depressive disorder and healthy controls. *Journal*
1074 *of Affective Disorders*. 222, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.06.052>
1075 SORGDRAGER, F. J., NAUDÉ, P. J., KEMA, I. P., NOLLEN, E. A., DEYN, P. P. D. (2019).
1076 Tryptophan metabolism in inflammaging: from biomarker to therapeutic target. *Frontiers in*
1077 *Immunology*. 10, 1-27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02565>
1078 SUYAMA, S., YADA, T. (2018). New insight into GABAergic neurons in the hypothalamic
1079 feeding regulation. *The Journal of Physiological Sciences*. 68(6), 717-722.
1080 <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0622-8>
1081 ŠIMIĆ, G., TKALČIĆ, M., VUKIĆ, V., MULC, D., ŠPANIĆ, E., ŠAGUD, M., OLUCHA-
1082 BORDONAU F. E., VUKŠIĆ, M., R HOF, P. (2021). Understanding emotions: Origins and
1083 roles of the amygdala. *Biomolecules*. 11(6), 823. <https://doi.org/10.3390/biom11060823>
1084 TANAKA, K., FURUYASHIKI, T., KITAOKA, S., SENZAI, Y., IMOTO, Y., SEGI-
1085 NISHIDA, E., DEGUCHI, Y., BREYER, M. R., BREYER, D. M., NARUMIYA, S. (2012).
1086 Prostaglandin E2-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for

- 1087 susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *Journal of Neuroscience*. 32(12), 4319-
11088 4329. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5952-11.2012>
- 2
31089 URRUTIA-PIÑONES, J., MORALES-MORAGA, C., SANGUINETTI-GONZÁLEZ, N.,
41090 ESCOBAR, A. P., & CHIU, C. Q. (2022). Long-range GABAergic projections of cortical origin
51091 in brain function. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 16, 1-53.
61092 <https://doi.org/10.3389/fnsys.2022.841869>
- 7
81093 USIELLO, A., DI FIORE, M. M., DE ROSA, A., FALVO, S., ERRICO, F., SANTILLO, A.,
91094 SANTILLO, A., NUZZO, T., CHIEFFI BACCARI, G. (2020). New Evidence on the Role of
101095 D-Aspartate Metabolism in Regulating Brain and Endocrine System Physiology: From
111096 Preclinical Observations to Clinical Applications. *International Journal of Molecular*
121097 *Sciences*. 21(22), 1-42. <https://doi.org/10.3390/ijms21228718>
- 13
14
151098 VERKUYL, J. M., KARST, H., JOËLS, M. (2005). GABAergic transmission in the rat
161099 paraventricular nucleus of the hypothalamus is suppressed by corticosterone and
171100 stress. *European Journal of Neuroscience*. 21(1), 113-121. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03846.x>
- 18
19
201102 WHEELER, M. D., IKEJEMA, K., ENOMOTO, N., STACKLEWITZ, R. F., SEABRA, V.,
211103 ZHONG, Z, YIN M., SCHEMMER, P., ROSE, M. L., RUSYN, I., BRADFORD, B.,
221104 THURMAN, R. G. (1999). Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cellular and*
231105 *Molecular Life Sciences*. 56(9), 843-856. <https://doi.org/10.1007/s000180050030>
- 24
25
261106 WOODLING, N. S., COLAS, D., WANG, Q., MINHAS, P., PANCHAL, M., LIANG, X.,
271107 MHATRE, S. D., BROWN H., KO N., ZAGOL-IKAPITTE I., VAN DER HART M.,
281108 KHROYAN T. V., CHULUUN B., PRIYAM P. G., MILNE G. L., RASSOULPOUR A.,
291109 BOUTAUD O., MANNING-BOĞ, H. HELLER, C., ANDREASSON, K. I. (2016).
301110 Cyclooxygenase inhibition targets neurons to prevent early behavioural decline in Alzheimer's
311111 disease model mice. *Brain*. 139(7), 2063-2081. <https://doi.org/10.1093/brain/aww117>
- 32
33
341112 XIAO, J. Y., XIONG, B. R., ZHANG, W., ZHOU, W. C., YANG, H., GAO, F., XIANG, H.
351113 B., MANYANDE, A., TIAN, X. B., TIAN, Y. K. (2018). PGE2-EP3 signaling exacerbates
361114 hippocampus-dependent cognitive impairment after laparotomy by reducing expression levels
371115 of hippocampal synaptic plasticity-related proteins in aged mice. *CNS Neuroscience &*
381116 *Therapeutics*, 24(10), 917–929. <https://doi.org/10.1111/cns.12832>
- 39
401117 XU, T. L., GONG, N. (2010). Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons:
411118 diversity, function and regulation. *Progress in Neurobiology*. 91(4), 349-361.
421119 <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.008>
- 43
441120 YAMADERA, W., INAGAWA, K., CHIBA, S., BANNAI, M., TAKAHASHI, M.,
451121 NAKAYAMA, K. (2007). Glycine ingestion improves subjective sleep quality in human
461122 volunteers, correlating with polysomnographic changes. *Sleep and Biological Rhythms*. 5(2),
471123 126-131. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8425.2007.00262.x>
- 48
49
501124 YANG, Y., WANG, J. Z. (2017). From structure to behavior in basolateral amygdala-
511125 hippocampus circuits. *Frontiers in Neural Circuits*. 11, 1-27.
521126 <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00086>
- 53
541127 YE, Z., SHI, L., LI, A., CHEN, C., XUE, G. (2020). Retrieval practice facilitates memory
551128 updating by enhancing and differentiating medial prefrontal cortex representations. *Elife*. 9, 1-
561129 24. <https://doi.org/10.7554/eLife.57023>
- 57
581130 YU, W., PATI, D., PINA, M. M., SCHMIDT, K. T., BOYT, K. M., HUNKER, A. C.,
591131 ZWEIFEL, L. S., MCELLIGOTT, Z. A., KASH, T. L. (2021). Periaqueductal gray/dorsal raphe

1132 dopamine neurons contribute to sex differences in pain-related behaviors. *Neuron*. 109(8),
11133 1365-1380. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.001>

2
3 1134 ZARBIN, M. A., WAMSLEY, J. K., KUHAR, M. J. (1981). Glycine receptor: light
4 1135 microscopic autoradiographic localization with [3H] strychnine. *Journal of Neuroscience*. 1(5),
5 1136 532-547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.01-05-00532.1981>

6
7 1137 ZHANG, H. J., SUN, R. P., LEI, G. F., YANG, L., LIU, C. X., (2008). Cyclooxygenase-2
8 1138 inhibitor inhibits hippocampal synaptic reorganization in pilocarpine-induced status epilepticus
9 1139 rats. *Journal of Zhejiang University Science B*. 11, 903-915.
10 1140 <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820018>

11
12 1141 ZHANG, X., VAN DEN POL, A. N., (2016). Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine
13 1142 hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. *Nature Neuroscience*.
14 1143 19(10):1341-1347. <https://doi.org/10.1038/nn.4372>

15
16 1144 ZIDAR, N., ODAR, K., GLAVAC, D., JERSE, M., ZUPANC, T., STAJER, D. (2009).
17 1145 Cyclooxygenase in normal human tissues—is COX- 1 really a constitutive isoform, and COX-
18 1146 2 an inducible isoform? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13(9b), 3753-3763.
19 1147 <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00430.x>

20
21 1148 ZOICAS, I., KORNHUBER, J. (2019). The role of metabotropic glutamate receptors in social
22 1149 behavior in rodents. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(6), 1-44.
23 1150 <https://doi.org/10.3390/ijms20061412>

24
25 1151
26 1152
27 1153
28 1154
29 1155
30 1156
31 1157
32 1158
33 1159
34 1160
35 1161
36 1162
37 1163
38 1164
39 1165
40 1166
41 1167
42 1168
43 1169
44 1170
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

Number of comparisons	Comparisons between groups	Investigated effect

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1	CNT + NaCl vs CNT + LPS	Does the LPS injection affect the value of the analyzed variable under control conditions?
2	CNT + NaCl vs CEL + NaCl	Does the injection of celecoxib affect the value of the analyzed variable?
3	CNT + LPS vs CEL + LPS	Is the response to LPS injection similar in animals that received saline and celecoxib?
4	CEL + NaCl vs CEL + LPS	Does the LPS injection affect the value of the analyzed variable in animals receiving celecoxib?
5	CNT + NaCl vs SC560 + NaCl	Does the SC560 injection affect the value of the analyzed variable?
6	CNT + LPS vs SC560 + LPS	Is the response to LPS injection similar in animals that received saline and SC560?
7	SC560 + NaCl vs SC560 + LPS	Does the LPS injection affect the value of the analyzed variable in animals that received SC560?
8	CEL + NaCl vs SC560 + NaCl	Do celecoxib or SC560 injections have the same effect on the value of the analyzed variable?
9	CEL + LPS vs SC560 + LPS	Does the LPS injection affect the value of the analyzed variable in animals that received celecoxib or SC560?

Table 1. Description of the comparisons and the effects studied on their basis. CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL -group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 - group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib.

Comparisons between groups	ASP	GLU	GLY	TYR	GABA	TRP
----------------------------	-----	-----	-----	-----	------	-----

CNT+NaCl vs CNT+LPS	$U=35,$ $p=0.791$	$U=35,$ $p=0.791$	$U=33,$ $p=0.659$	$U=10,$ $p=0.008$	$U=32,$ $p=0.596$	$U=33,$ $p=0.659$
CNT+NaCl vs CEL+NaCl	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=19,$ $p=0.010$	$U=34,$ $p=0.152$	$U=53,$ $p=0.918$	$U=19,$ $p=0.010$	$U=28,$ $p=0.061$
CNT+NaCl vs SC560+NaCl	$U=33,$ $p=0.009$	$U=63,$ $p=0.330$	<u>$U=24,$</u> <u>$p=0.002$</u>	<u>$U=9,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=38,$ $p=0.020$	$U=42,$ $p=0.036$
CNT+LPS vs CEL+LPS	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=29,$ $p=0.211$	$U=28,$ $p=0.261$	$U=36,$ $p=0.650$	$U=37,$ $p=0.536$	$U=24,$ $p=0.142$
CNT+LPS vs SC560+LPS	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=38,$ $p=0.332$	<u>$U=7,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=16,$ $p=0.009$	$U=36,$ $p=0.267$
CEL+NaCl vs SC560+NaCl	<u>$U=4,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=10,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=57,$ $p=0.338$	$U=46,$ $p=0.115$	<u>$U=10,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=45,$ $p=0.103$
CEL+LPS vs SC560+LPS	$U=86,$ $p=0.618$	$U=62,$ $p=0.108$	$U=61,$ $p=0.167$	$U=71,$ $p=0.373$	<u>$U=27,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=60,$ $p=0.152$
CEL+NaCl vs CEL+LPS	$U=57,$ $p=0.648$	$U=33,$ $p=0.049$	$U=56,$ $p=0.821$	$U=58,$ $p=0.923$	$U=38,$ $p=0.101$	$U=58,$ $p=0.923$
SC560+NaCl vs SC560+LPS	<u>$U=10,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=109,$ $p=0.902$	$U=103,$ $p=0.713$	$U=67,$ $p=0.613$	$U=90,$ $p=0.367$	$U=64,$ $p=0.453$

Table 2. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for the concentration of selected amino acid neurotransmitters [ng/g] in the amygdala. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY – glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

Comparisons between groups	ASP	GLU	GLY	TYR	GABA	TRP
CNT+NaCl vs CNT+LPS	$U=11,$ $p=0.310$	$U=22,$ $p=0.200$	$U=33,$ $p=0.815$	$U=21,$ $p=0.279$	$U=22,$ $p=0.200$	$U=24,$ $p=0.277$
CNT+NaCl vs CEL+NaCl	$U=13,$ $p=0.295$	$U=14,$ $p=0.121$	$U=0,$ $p<0.001$	$U=35,$ $p=0.963$	$U=6,$ $p=0.005$	$U=8,$ $p=0.010$
CNT+NaCl vs SC560+NaCl	$U=30,$ $p=0.267$	$U=35,$ $p=0.115$	$U=16,$ $p=0.003$	$U=38,$ $p=0.169$	$U=8,$ $p<0.001$	$U=21,$ $p=0.011$
CNT+LPS vs CEL+LPS	$U=18,$ $p=0.072$	$U=50,$ $p=0.601$	$U=1,$ $p<0.001$	$U=44,$ $p=0.325$	$U=17,$ $p=0.004$	$U=46,$ $p=0.305$
CNT+LPS vs SC560+LPS	$U=19,$ $p=0.033$	$U=45,$ $p=0.393$	$U=8,$ $p<0.001$	$U=60,$ $p=0.834$	$U=25,$ $p=0.007$	$U=44,$ $p=0.121$
CEL+NaCl vs SC560+NaCl	$U=52,$ $p=1$	$U=37,$ $p=0.298$	$U=53,$ $p=0.681$	$U=31,$ $p=0.030$	$U=36,$ $p=0.132$	$U=58,$ $p=0.925$
CEL+LPS vs SC560+LPS	$U=90,$ $p=0.556$	$U=67,$ $p=0.390$	$U=59,$ $p=0.204$	$U=58,$ $p=0.014$	$U=89,$ $p=0.531$	$U=91,$ $p=0.400$
CEL+NaCl vs CEL+LPS	$U=41,$ $p=0.757$	$U=41,$ $p=0.757$	$U=42,$ $p=0.500$	$U=56,$ $p=0.520$	$U=35,$ $p=0.238$	$U=50,$ $p=0.714$
SC560+NaCl vs SC560+LPS	$U=115,$ $p=0.861$	$U=58,$ $p=0.072$	$U=57,$ $p=0.065$	$U=118,$ $p=0.953$	$U=106,$ $p=0.599$	$U=107,$ $p=0.626$

Table 3. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for the concentration of selected amino acid neurotransmitters [ng/g] in the brainstem. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY – glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

Comparisons between groups	ASP	GLU	GLY	TYR	GABA	TRP
CNT+NaCl vs CNT+LPS	$U=35,$ $p=0.963$	$U=26,$ $p=0.370$	$U=31,$ $p=0.673$	$U=34,$ $p=0.888$	$U=26,$ $p=0.370$	$U=20,$ $p=0.139$
CNT+NaCl vs CEL+NaCl	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=38,$ $p=0.084$	$U=30,$ $p=0.025$	$U=45,$ $p=0.194$	$U=27,$ $p=0.015$	$U=36,$ $p=0.096$
CNT+NaCl vs SC560+NaCl	$U=53,$ $p=0.557$	$U=51,$ $p=0.347$	<u>$U=8,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=49,$ $p=0.290$	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=62,$ $p=0.770$
CNT+LPS vs CEL+LPS	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=3,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=26,$ $p=0.042$	$U=27,$ $p=0.501$	<u>$U=1,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=26,$ $p=0.042$
CNT+LPS vs SC560+LPS	<u>$U=10,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=14,$</u> <u>$p=0.002$</u>	$U=39,$ $p=0.190$	<u>$U=17,$</u> <u>$p=0.004$</u>	$U=58,$ $p=0.925$	<u>$U=16,$</u> <u>$p=0.003$</u>
CEL+NaCl vs SC560+NaCl	<u>$U=38,$</u> <u>$p=0.003$</u>	$U=103,$ $p=0.713$	<u>$U=45,$</u> <u>$p=0.003$</u>	$U=79,$ $p=0.174$	<u>$U=0,$</u> <u>$p=0$</u>	$U=61,$ $p=0.568$
CEL+LPS vs SC560+LPS	<u>$U=0,$</u> <u>$p=0$</u>	<u>$U=37,$</u> <u>$p=0.001$</u>	$U=83,$ $p=0.354$	<u>$U=30,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=18,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=31,$</u> <u>$p<0.001$</u>
CEL+NaCl vs CEL+LPS	$U=61,$ $p=0.033$	<u>$U=23,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=73,$ $p=0.172$	$U=66,$ $p=0.093$	<u>$U=29,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=61,$ $p=0.094$
SC560+NaCl vs SC560+LPS	$U=70,$ $p=0.134$	$U=102,$ $p=0.683$	<u>$U=48,$</u> <u>$p=0.007$</u>	<u>$U=48,$</u> <u>$p=0.007$</u>	$U=47,$ $p=0.011$	$U=70,$ $p=0.081$

Table 4. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for the concentration of selected amino acid neurotransmitters [ng/g] in the hippocampus. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY – glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

Comparisons between groups	ASP	GLU	GLY	TYR	GABA	TRP
CNT+NaCl vs CNT+LPS	$U=31,$ $p=0.460$	<u>$U=4,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=20,$ $p=0.083$	$U=40,$ $p=1$	$U=31,$ $p=0.460$	$U=25,$ $p=0.203$
CNT+NaCl vs CEL+NaCl	$U=63,$ $p=0.531$	<u>$U=2,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=50,$ $p=0.177$	$U=48,$ $p=0.144$	<u>$U=16,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=12,$</u> <u>$p<0.001$</u>
CNT+NaCl vs SC560+NaCl	$U=62,$ $p=0.495$	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=6,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>
CNT+LPS vs CEL+LPS	$U=55,$ $p=0.776$	$U=41,$ $p=0.238$	$U=52,$ $p=0.815$	$U=44,$ $p=0.441$	$U=50,$ $p=0.548$	$U=58,$ $p=0.925$
CNT+LPS vs SC560+LPS	$U=60,$ $p=1$	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=19,$ $p=0.007$	<u>$U=1,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>
CEL+NaCl vs SC560+NaCl	$U=78,$ $p=0.161$	<u>$U=29,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=62,$ $p=0.037$	<u>$U=42,$</u> <u>$p=0.003$</u>	$U=54,$ $p=0.015$	$U=101,$ $p=0.653$
CEL+LPS vs SC560+LPS	$U=99,$ $p=0.595$	<u>$U=0,$</u> <u>$p=0$</u>	<u>$U=0,$</u> <u>$p=0$</u>	<u>$U=27,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=14,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=0,$</u> <u>$p=0$</u>
CEL+NaCl vs CEL+LPS	$U=71,$ $p=0.089$	$U=50,$ $p=0.009$	$U=71,$ $p=0.146$	$U=97,$ $p=0.747$	$U=58,$ $p=0.024$	<u>$U=39,$</u> <u>$p=0.002$</u>
SC560+NaCl vs SC560+LPS	$U=95,$ $p=0.486$	$U=67,$ $p=0.061$	$U=111,$ $p=0.967$	$U=99,$ $p=0.595$	$U=93,$ $p=0.436$	$U=112,$ $p=1$

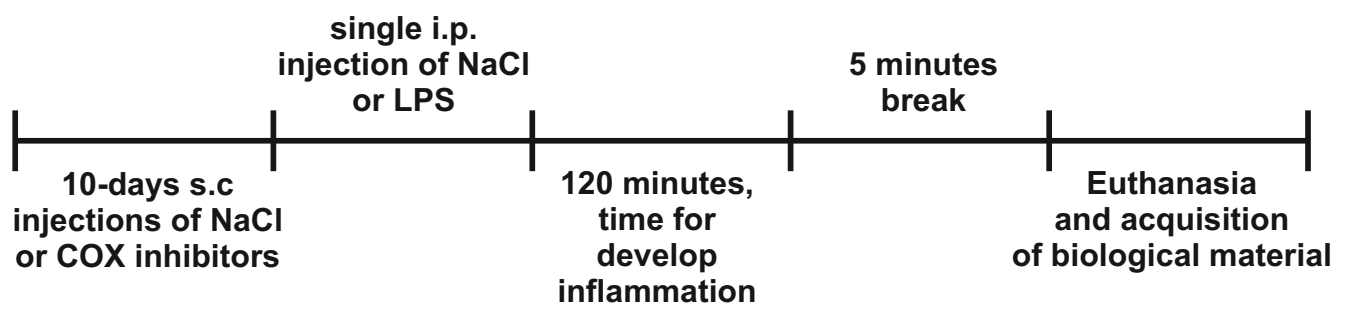
Table 5. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for the concentration of selected amino acid neurotransmitters [ng/g] in the hypothalamus. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY – glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

Comparisons between groups	ASP	GLU	GLY	TYR	GABA	TRP
CNT+NaCl vs CNT+LPS	$U=31,$ $p=1$	$U=25,$ $p=0.779$	$U=26,$ $p=0.606$	$U=16,$ $p=0.070$	$U=30,$ $p=0.918$	$U=25,$ $p=0.536$
CNT+NaCl vs CEL+NaCl	$U=32,$ $p=0.035$	$U=25,$ $p=0.024$	$U=30,$ $p=0.025$	$U=34,$ $p=0.023$	<u>$U=16,$</u> <u>$p=0.001$</u>	$U=51,$ $p=0.109$
CNT+NaCl vs SC560+NaCl	$U=61,$ $p=0.726$	<u>$U=7,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=54,$ $p=0.446$	$U=58,$ $p=0.367$	$U=55,$ $p=0.482$	$U=40,$ $p=0.027$
CNT+LPS vs CEL+LPS	$U=17,$ $p=0.011$	$U=52,$ $p=1$	$U=43,$ $p=0.877$	$U=20,$ $p=0.021$	$U=48,$ $p=0.783$	$U=14,$ $p=0.0051!$
CNT+LPS vs SC560+LPS	<u>$U=6,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=38,$ $p=0.332$	$U=35,$ $p=0.322$	<u>$U=4,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=47,$ $p=0.913$	$U=50,$ $p=0.891$
CEL+NaCl vs SC560+NaCl	$U=51,$ $p=0.010$	<u>$U=6,$</u> <u>$p=0$</u>	$U=53,$ $p=0.013$	$U=77,$ $p=0.149$	<u>$U=38,$</u> <u>$p=0.001$</u>	$U=72,$ $p=0.100$
CEL+LPS vs SC560+LPS	$U=59,$ $p=0.046$	$U=92,$ $p=0.412$	$U=68,$ $p=0.280$	<u>$U=39,$</u> <u>$p=0.003$</u>	$U=95,$ $p=0.683$	<u>$U=31,$</u> <u>$p<0.001$</u>
CEL+NaCl vs CEL+LPS	$U=104,$ $p=0.744$	$U=51,$ $p=0.010$	$U=42,$ $p=0.010$	<u>$U=34,$</u> <u>$p<0.001$</u>	$U=49,$ $p=0.008$	<u>$U=12,$</u> <u>$p<0.001$</u>
SC560+NaCl vs SC560+LPS	<u>$U=23,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=41,$</u> <u>$p=0.002$</u>	$U=75,$ $p=0.201$	$U=102,$ $p=0.915$	$U=69,$ $p=0.123$	$U=85,$ $p=0.267$

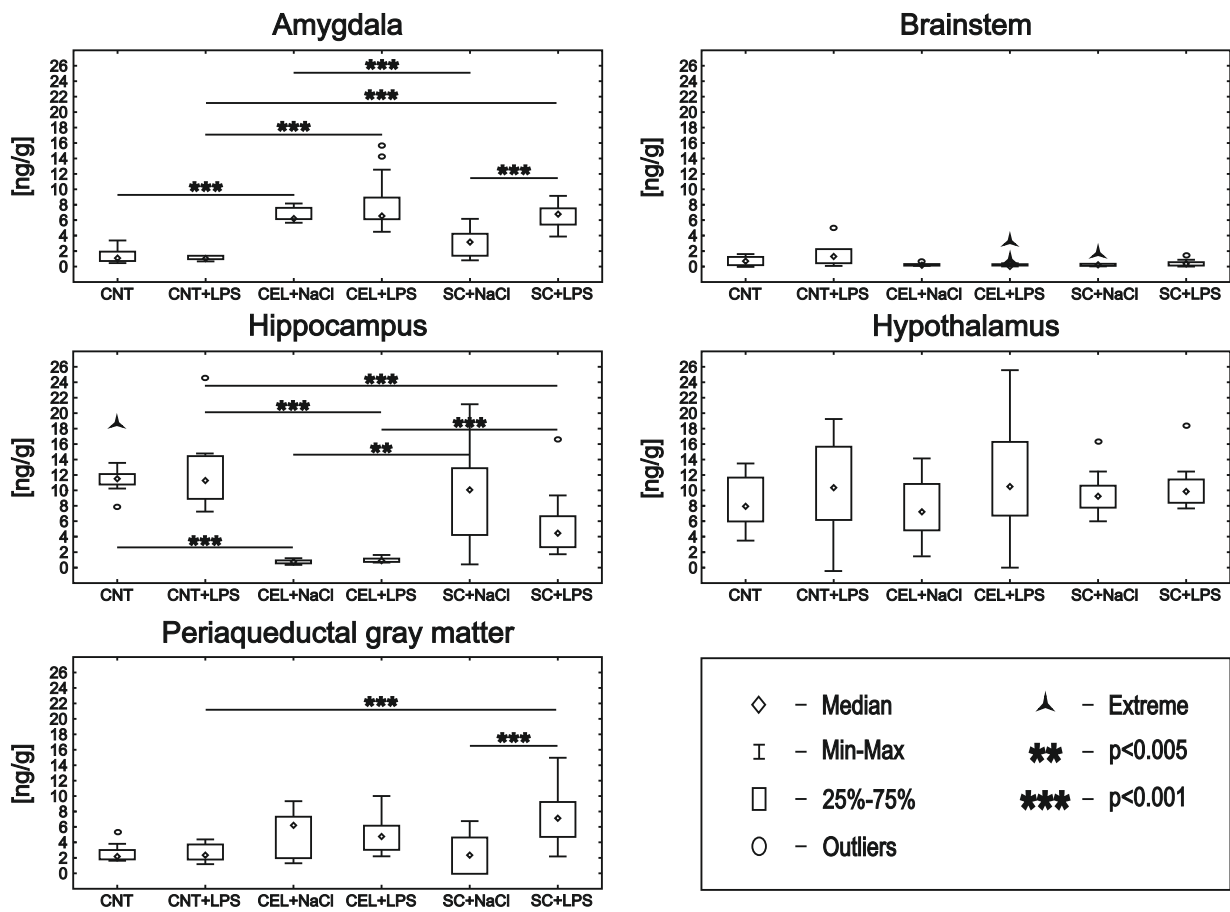
Table 6. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for the concentration of selected amino acid neurotransmitters [ng/g] in the periaqueductal gray matter. ASP – aspartate, GLU – glutamate, GLY – glycine, TYR – tyrosine, GABA – gamma-aminobutyric acid, TRP – tryptophane, CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.

Comparisons between groups	Il-1 β	TNF- α
CNT+NaCl vs CNT+LPS	$U=3,$ $p=0.400$	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.005$</u>
CNT+NaCl vs CEL+NaCl	$U=6,$ $p=1$	$U=35,$ $p=0.322$
CNT+NaCl vs SC560+NaCl	$U=10,$ $p=0.469$	<u>$U=0,$</u> <u>$p<0.001$</u>
CNT+LPS vs CEL+LPS	$U=8,$ $p=0.058$	$U=39,$ $p=0.841$
CNT+LPS vs SC560+LPS	$U=7,$ $p=0.025$	$U=9,$ $p=0.007$
CEL+NaCl vs SC560+NaCl	$U=19,$ $p=0.945$	<u>$U=0,$</u> <u>$p=0$</u>
CEL+LPS vs SC560+LPS	$U=81,$ $p=0.900$	<u>$U=18,$</u> <u>$p<0.001$</u>
CEL+NaCl vs CEL+LPS	$U=4,$ $p=0.013$	<u>$U=0,$</u> <u>$p=0$</u>
SC560+NaCl vs SC560+LPS	<u>$U=5,$</u> <u>$p<0.001$</u>	<u>$U=1,$</u> <u>$p=0$</u>

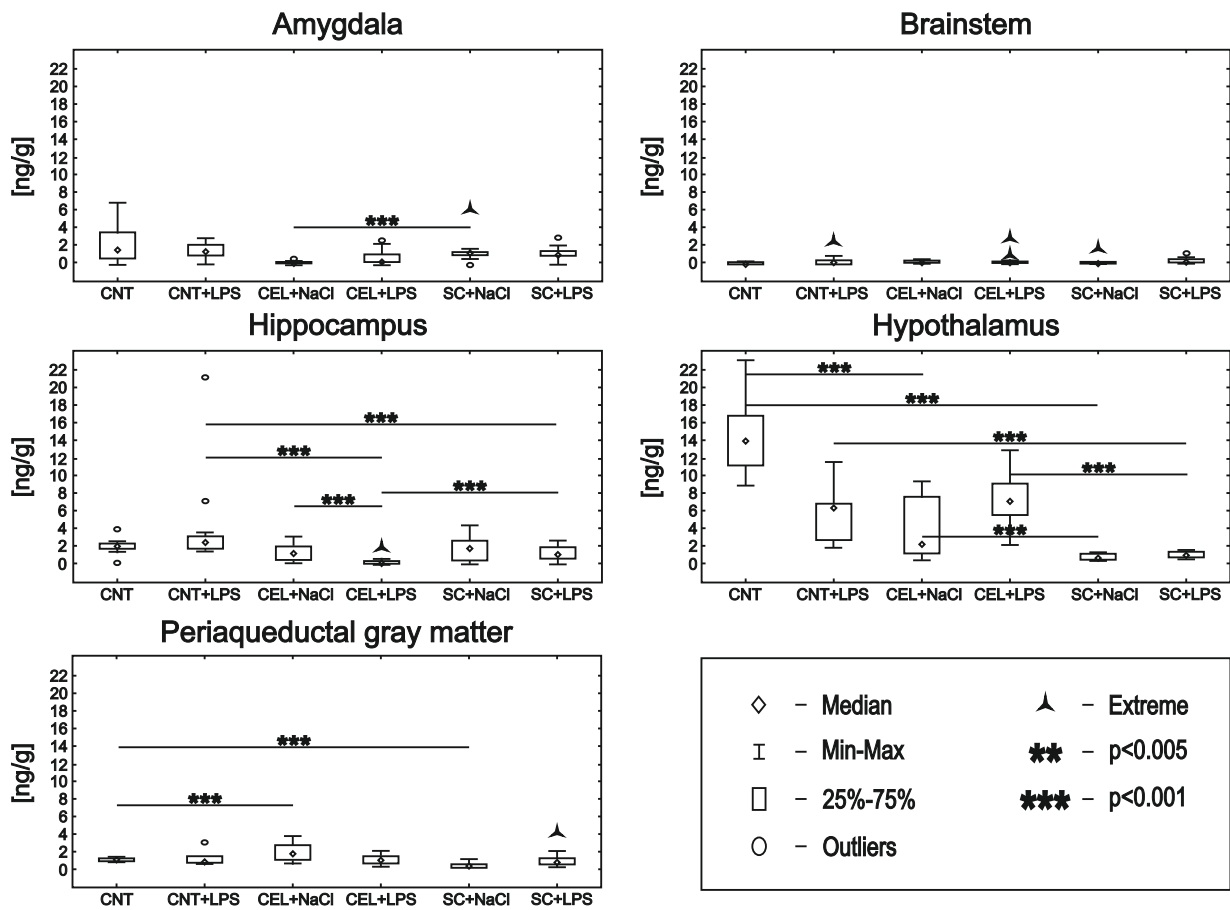
Table 7. The results of intragroup comparisons using the Mann-Whitney U test (with Bonferroni correction) for the concentration of plasma compounds [pg/ml] in animal plasma. Il-1 β – interleukin 1 β , TNF- α – tumor necrosis factor α , CNT – group of animals receiving long-term subcutaneously 0.9% saline solution, NaCl – single intraperitoneal injection of 0.9% saline solution, LPS – single intraperitoneal lipopolysaccharide injection, CEL – group of animals receiving long-term subcutaneously celecoxib, SC560 – group of animals receiving long-term subcutaneously SC560.



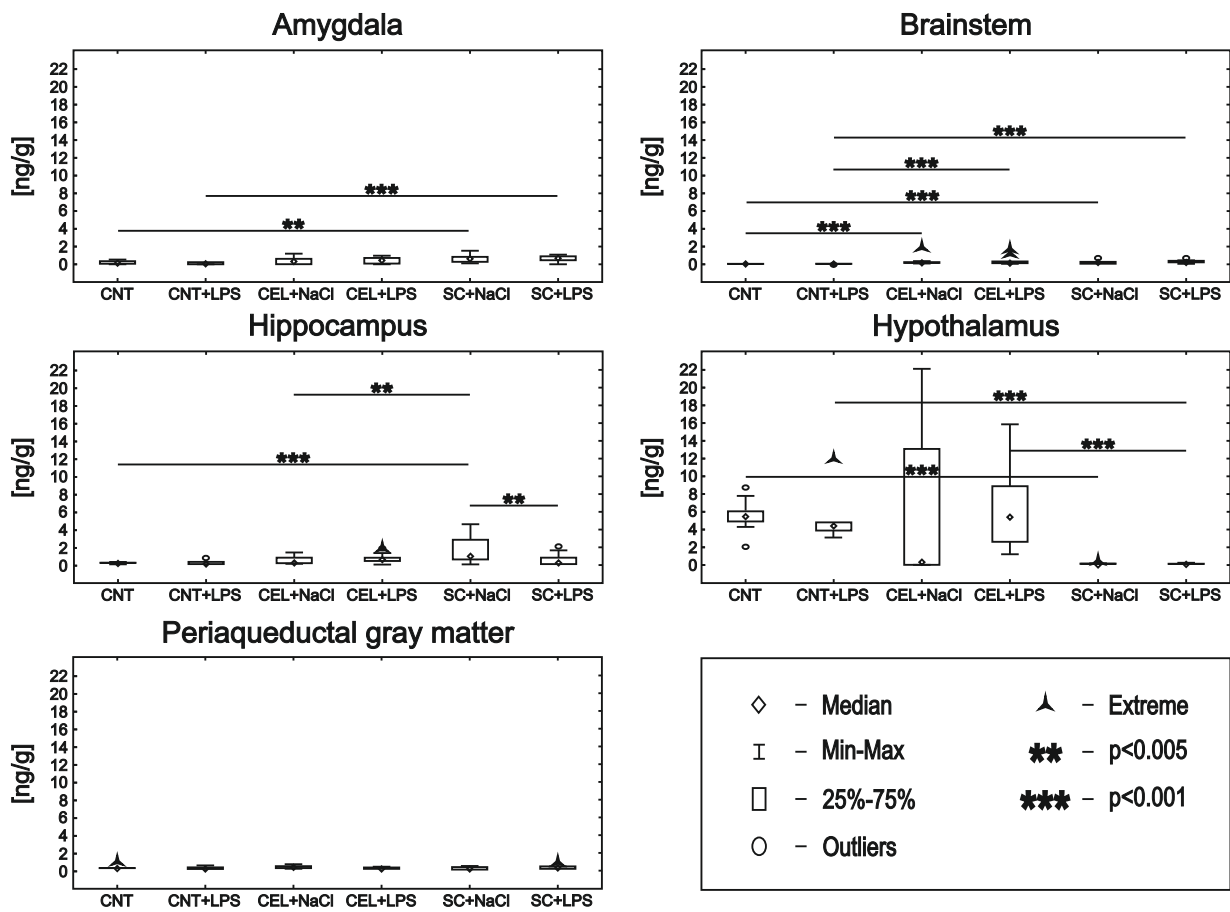
Aspartate concentration in selected brain structures



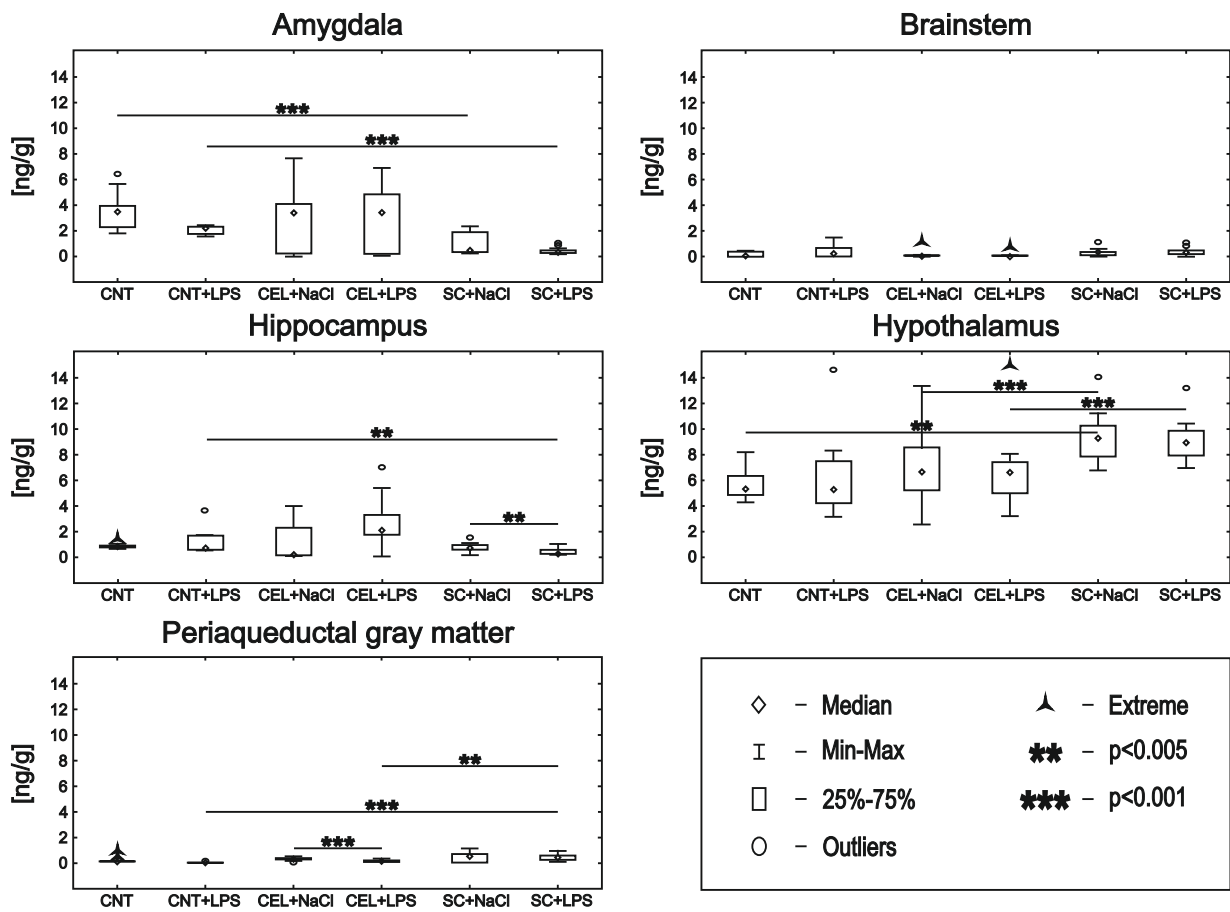
Glutamate concentration in selected brain structures



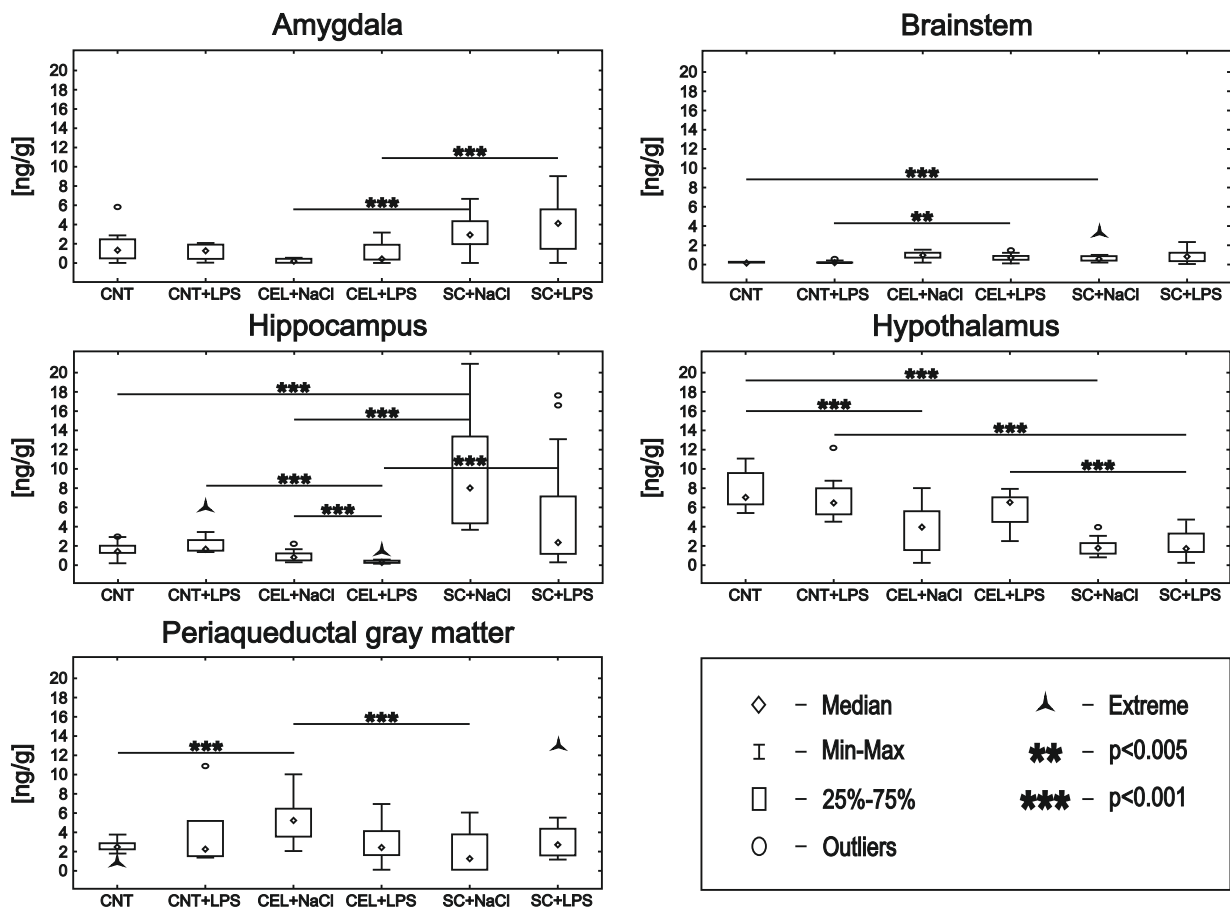
Glycine concentration in selected brain structures



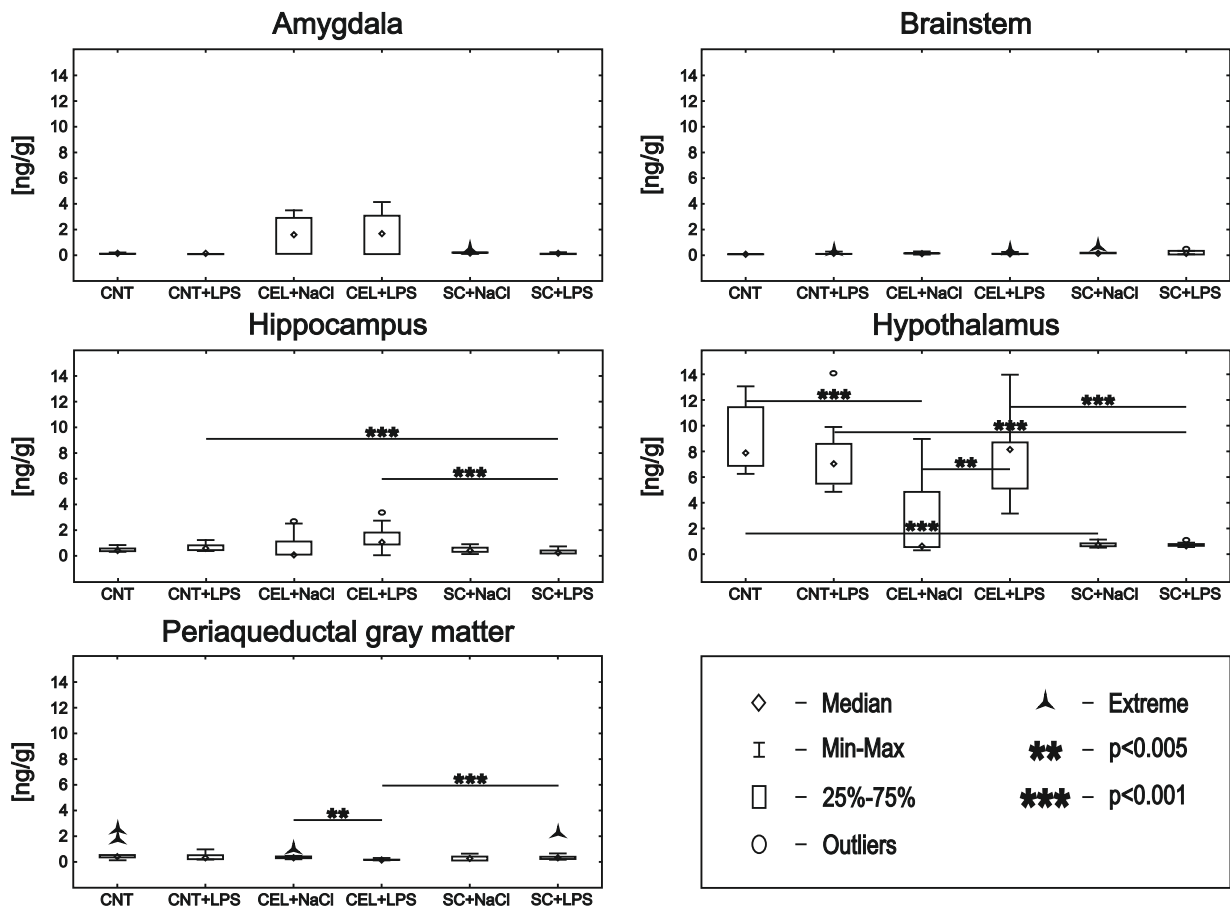
Tyrosine concentration in selected brain structures

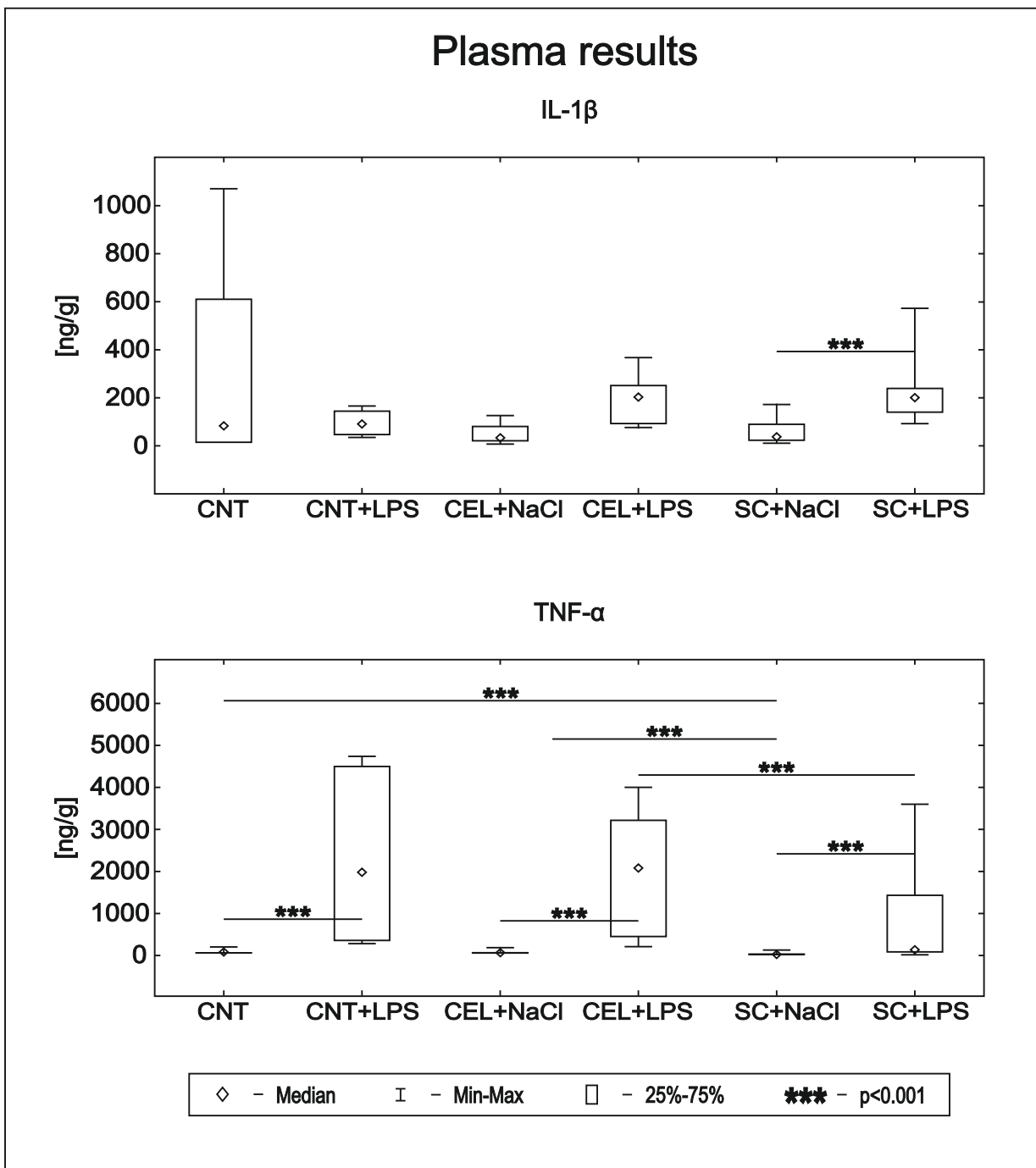


GABA concentration in selected brain structures



Tryptophan concentration in selected brain structures





Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain

Paweł Napor^{a*}, Anna Kobjrzycka^a, Krystyna Pierzchała-Koziec^b, Marek Wiczorek(ORCID:
0000-0002-0862-8076)^{a*}

^a Department of Neurobiology, University of Łódź, Faculty of Biology and Environmental Protection, Pomorska street 141/143, 90-236 Łódź, Poland

^b Department of Animal Physiology and Endocrinology, University of Agriculture in Kraków, 24/28 Adam Mickiewicz Avenue, 30-059 Kraków, Poland

* *Corresponding authors:*

pawel.napora@edu.uni.lodz.pl and marek.wiczorek@biol.uni.lodz.pl

9. Oświadczenia współautorów publikacji

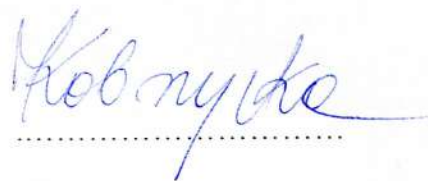
Łódź, dnia 2.02.2023.

Dr Anna Kobrzycka

Katedra Neurobiologii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy przedstawionej przez: P. Naporę, A. Kobrzycką, M. Wieczorek, zatytułowanej „Prostaglandyna E2 jako cząsteczka komunikacji pomiędzy układem nerwowym i odpornościowym” oraz opublikowanej w czasopiśmie *KOMSOS*, 69(2), 287-300, DOI:10.36921/kos.2020_2559, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 10% i obejmował redagowanie tekstu manuskryptu i przedstawionych rycin oraz pomoc przy doborze literatury naukowej



.....

Łódź, dnia 2.02.2023.

Dr Anna Kobrzycka

Katedra Neurobiologii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy przedstawionej przez: P. Naporę, A. Kobrzycką, K. Pierzchałę-Koziec, M. Wieczorek, zatytułowanej „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain” oraz opublikowanej w czasopiśmie *Behavioural Brain Research*, 438(2023), 1-15, DOI:10.1016/j.bbr.2022.114143, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 10% i obejmował pomoc podczas procesu analizy statystycznej danych liczbowych, redagowanie tekstu manuskryptu oraz przedstawianych rycin


.....

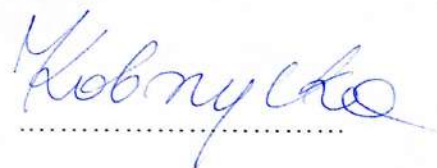
Łódź, dnia 2.02.2023.

Dr Anna Kobrzycka

Katedra Neurobiologii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w manuskrypcie przedstawionym przez: Napora P., Kobrzycka A., Pierzchała-Koziec K., Wiczorek M, zatytułowanym „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain” i przekazany do czasopisma *Behavioural Brain Research*, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 10% i obejmował pomoc podczas procesu analizy statystycznej danych liczbowych, redagowanie tekstu manuskryptu oraz przedstawianych rycin



.....

Łódź, dnia 11.04.2023r.

prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt,
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy przedstawionej przez: P. Napora, A. Kobrzycka, K. Pierzchała-Koziec, M. Wieczorek, zatytułowanej „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain” oraz opublikowanej w czasopiśmie *Behavioural Brain Research*, 438(2023), 1-15, DOI:10.1016/j.bbr.2022.114143, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 10% i obejmował:

Oznaczenia i merytoryczną analizę wyników kortykosteronu i interleukiny-6.

Krzysztof Płoniec
.....

Łódź, dnia 11.04.2023

prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt,
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w manuskrypcie przedstawionym przez: Napura P., Kobrzycka A., Pierzchała-Koziec K., Wieczorek M, zatytułowanym „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain” i przekazanym do czasopisma *Behavioural Brain Research*, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 10% i obejmował:

Oznaczenia i merytoryczną analizę zmian wybranych parametrów fizjologicznych.

Krzysztof Koziec

Łódź, dnia 11.04.2023 r.

Dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ
Katedra Neurobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy przedstawionej przez: P. Napora, A. Kobrzycka, M. Wieczorek. (2020), zatytułowanej „Prostaglandyna E2 jako cząsteczka komunikacji pomiędzy układem nerwowym i odpornościowym” oraz opublikowanej w czasopiśmie *KOMSOS*, 69(2), 287-300, DOI:10.36921/kos.2020_2559, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 10% i obejmował:

- - korekty tekstu manuskryptu, oraz sugestie dotyczące planu manuskryptu,
- autor korespondencyjny podczas procesu publikacji manuskryptu.



Łódź, dnia 11.04.2023 r.

Dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ
Katedra Neurobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódźki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy przedstawionej przez: P. Napora, A. Kobrzycka, K. Pierzchała-Koziec, M. Wieczorek, zatytułowanej „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain” oraz opublikowanej w czasopiśmie *Behavioural Brain Research*, 438(2023), 1-15, DOI:10.1016/j.bbr.2022.114143, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 10% i obejmował:

- pozyskanie środków finansowych niezbędnych do przeprowadzenia doświadczenia, zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu na żywych zwierzętach,
- korekty tekstu manuskryptu, autor korespondencyjny podczas procesu publikacji manuskryptu.


.....

Łódź, dnia 11.04.2023 r.

Dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ
Katedra Neurobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy przedstawionej przez: Naporę P., Kobrzycką A., Pierzchała-Koziec K., Wieczorek M, zatytułowanej „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain” i przekazanej do czasopisma *Behavioural Brain Research*, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 10% i obejmował:

- pozyskanie środków finansowych niezbędnych do przeprowadzenia doświadczenia, zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu na żywych zwierzętach,
- korekty tekstu manuskryptu, autor korespondencyjny podczas procesu publikacji manuskryptu.



Łódź, 12.04.2023

mgr Paweł Napora

Katedra Neurobiologii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy przedstawionej przez: P. Napora, A. Kobrzycka, M. Wieczorek, zatytułowanej „Prostaglandyna E2 jako cząsteczka komunikacji pomiędzy układem nerwowym i odpornościowym” oraz opublikowanej w czasopiśmie *KOMSOS*, 69(2), 287-300, DOI:10.36921/kos.2020_2559, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 80% i obejmował:

- Przygotowanie publikacji:
 - przygotowanie publikacji (przygotowanie manuskryptu, przegląd i dobór literatury naukowej, przygotowanie rycin, formatowanie tekstu, przygotowanie materiałów wymaganych do opublikowania manuskryptu)

Pozostali autorzy podczas procesu publikacji manuskryptu byli odpowiedzialni za:

- dr Anna Kobrzycka
 - redagowanie tekstu manuskryptu oraz przedstawionych rycin, pomoc przy doborze literatury naukowej
- dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ
 - korekty tekstu manuskryptu, autor korespondencyjny podczas procesu publikacji manuskryptu



Łódź, 12.04.2023

mgr Paweł Napora

Katedra Neurobiologii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy przedstawionej przez: P. Napora, A. Kobrzycka, K. Pierzchała-Koziec, M. Wieczorek, zatytułowanej „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain” oraz opublikowanej w czasopiśmie *Behavioural Brain Research*, 438(2023), 1-15, DOI:10.1016/j.bbr.2022.114143, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 70% i obejmował:

- Przeprowadzenie eksperymentu:
 - analiza chromatograficzna monoamin zawartych w strukturach mózgowia szczurów (pień mózgu, podwzgórze, formacja hipokampa, przyśrodkowa kora przedczołowa), przygotowanie wzorców, obliczenia i analiza wyników
 - analiza danych behawioralnych (pozyskanie danych liczbowych)
 - analiza danych biochemicznych dotyczących zawartości związków rozpuszczalnych w osoczu zwierząt (pozyskanie danych liczbowych)

- Przygotowanie publikacji:
 - analiza statystyczna danych eksperymentalnych (analiza rozkładów danych, sformułowanie i weryfikacja dwustronnych hipotez statystycznych, interpretacja wyników)
 - przygotowanie publikacji (przygotowanie manuskryptu, przegląd i dobór literatury naukowej, przygotowanie rycin, formatowanie tekstu, przygotowanie materiałów wymaganych do opublikowania manuskryptu)

Pozostali autorzy podczas procesu publikacji manuskryptu byli odpowiedzialny za:

- dr Anna Kobrzycka
 - pomoc podczas procesu analizy statystycznej danych liczbowych, redagowanie tekstu manuskryptu oraz przedstawianych rycin
- prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec
 - przeprowadzenie analiz: radioimmunologicznej (RIA) kortykosteronu oraz immunoenzymatycznej (ELISA) IL-6 w osoczu zwierząt, przygotowanie wstępnego opisu wykorzystanych metod
- dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ
 - pozyskanie środków finansowych niezbędnych do przeprowadzenia doświadczenia, zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu na żywych zwierzętach, korekty tekstu manuskryptu, autor korespondencyjny podczas procesu publikacji manuskryptu

Ryszard Napora.....

Łódź, 12.04.2023

mgr Paweł Napora

Katedra Neurobiologii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w manuskrypcie przedstawionym przez: Napora P., Kobrzycka A., Pierzchała-Koziec K., Wieczorek M, zatytułowanym „Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain” i przekazanym do czasopisma *Behavioural Brain Research*, mój wkład merytoryczny w przygotowanie publikacji był równy 70% i obejmował:

- Przeprowadzenie eksperymentu:
 - analiza chromatograficzna aminokwasów zawartych w strukturach mózgowia szczurów (ciało migdałowe, pień mózgu, hipokamp, podwzgórze oraz istota szara okołowodociągowa), przygotowanie wzorców, obliczenia i analiza wyników
 - analiza danych biochemicznych dotyczących zawartości związków prozapalnych w osoczu zwierząt (pozyskanie danych liczbowych)

- Przygotowanie publikacji:
 - analiza statystyczna danych eksperymentalnych (analiza rozkładów danych, sformułowanie i weryfikacja dwustronnych hipotez statystycznych, interpretacja wyników)
 - przygotowanie publikacji (przygotowanie manuskryptu, przegląd i dobór literatury naukowej, przygotowanie rycin, formatowanie tekstu, przygotowanie materiałów wymaganych do opublikowania manuskryptu)

Pozostali autorzy podczas procesu publikacji manuskryptu byli odpowiedzialny za:

- dr Anna Kobrzycka
 - pomoc podczas procesy analizy statystycznej danych liczbowych, redagowanie tekstu manuskryptu oraz przedstawianych rycin
- prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec
 - przeprowadzenie analiz immunoenzymatycznych (ELISA) TNF- α , IL-1 β w osoczu zwierząt, przygotowanie wstępnego opisu wykorzystanych metod
- dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ
 - pozyskanie środków finansowych niezbędnych do przeprowadzenia doświadczenia, zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu na żywych zwierzętach, korekty tekstu manuskryptu, autor korespondencyjny podczas procesu publikacji manuskryptu

Janina Naprawa