

mgr inż. Jan Detka

Wybrane szlaki metaboliczne w mózgu w zwierzęcym modelu depresji

Streszczenie:

Depresja jest chorobą psychiczną o złożonej, jednak wciąż słabo poznanej etiologii. Wiele danych klinicznych i doświadczalnych wskazuje, że nadmierne działanie glikokortykoidów wynikające z dysregulacji osi podwzgórze – przysadka mózgowa – nadnercza (HPA) jest ważnym czynnikiem w patogenezie tej choroby. Ponadto, wyniki licznych badań pokazują, iż przewlekła ekspozycja na podwyższony poziom glikokortykoidów prowadzi nie tylko do wystąpienia wielu zmian morfologicznych, fizjologicznych i czynnościowych w ośrodkowym układzie nerwowym, charakterystycznych dla pacjentów z depresją, lecz również w znaczącym stopniu zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju schorzeń metabolicznych, głównie cukrzycy typu II. Pomimo dość dobrze zbadanego wpływu glikokortykoidów na obwodowy metabolizm glukozy, niewielka uwaga została dotychczas poświęcona ich oddziaływaniu na przemianę węglowodanów w ośrodkowym układzie nerwowym. Mózg, jako narząd o dużej aktywności metabolicznej wymaga stałego dostępu glukozy, jako źródła energii, dlatego też wszelkie nieprawidłowości w jej zużyciu mogą skutkować poważnymi zmianami w funkcjonowaniu komórek nerwowych, które mogą leżeć u podstaw rozwoju depresji.

Celem pracy było określenie czy stres prenatalny u szczurów (zwierzęcy model depresji) może wywierać wpływ na stężenie glukozy i glikogenu, transport glukozy, proces glikolizy, cykl Krebsa, fosforylację oksydacyjną, szlak pentozofosforanowy, a także działanie hormonów regulujących metabolizm glukozy: insuliny i glukagono-podobnego peptydu-1 (GLP-1). Wybrane markery metaboliczne oznaczane były w korze czołowej i hipokampie, czyli strukturach, w których głównie obserwowane są zmiany w depresji a insulina i GLP-1 także w podwzgórz, regionie mózgu zaangażowanym w centralną regulację homeostazy energetycznej organizmu. W celu sprawdzenia, czy stres prenatalny może zmieniać odpowiedź na inne niekorzystne bodźce, działające w

dorostym życiu, badane czynniki oznaczano zarówno w warunkach podstawowych jak również u zwierząt poddanych stresowi ostremu oraz otrzymujących glukozę.

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Sprague-Dawley. Ciężarne samice szczurów były poddawane codziennie trzem sesjom stresu unieruchomienia od czternastego dnia ciąży do dnia wykotu. Po upływie 3 miesięcy młode samce, będące potomstwem matek stresowanych i samic kontrolnych zostały poddane testowi wymuszonego pływania, w celu weryfikacji zastosowanego modelu depresji. Następnego dnia część szczurów kontrolnych i stresowanych prenatalnie poddano stresowi ostremu (stres unieruchomienia, 1 godzina). Połowię zwierząt ze wszystkich grup eksperymentalnych podano glukozę (1 g/kg, doustnie). Po 2 godzinach od obciążenia glukozą zwierzęta zabito przez dekapitację, a następnie pobrano od nich krew i struktury mózgu. Poziom glukozy, glikogenu oraz metabolitów glikolizy (pirogronian i L-mleczan) w korze i hipokampie została zmierzona fluorymetrycznie. Stężenia transporterów glukozy, enzymów glikolizy i cyklu Krebsa, a także zawartość insuliny, GLP-1, ich receptorów oraz kortykosteronu określano metodą ELISA. Aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej oraz kompleksu IV oksydazy cytochromu c oznaczano metodą kolorymetryczną.

Stres prenatalny spowodował u szczurów zmiany pro-depresyjne, które wyrażały się wydłużeniem u nich czasu bezruchu przy jednoczesnym skróceniu czasu pływania i czasu wspinania w teście wymuszonego pływania. Zwierzęta prenatalnie stresowane charakteryzowały się podwyższoną zawartością glukozy zarówno w osoczu krwi, jak również w hipokampie, a także zwiększoną akumulacją glikogenu w korze czołowej. Zmiany te były widoczne zarówno w warunkach podstawowych jak również pod wpływem dodatkowych czynników stresowych. Wykazano także, że podwyższona zawartość glukozy i glikogenu w badanych strukturach może być spowodowana zwiększoną ekspresją białek transportujących glukozę, a w szczególności GLUT1, którego poziom był istotnie wyższy u zwierząt prenatalnie stresowanych poddanych dodatkowo stresowi ostremu.

W kolejnych badaniach stwierdzono, że zwiększenie poziomu glukozy oraz glikogenu w strukturach mózgu nie wynikało z osłabienia procesu glikolizy, ponieważ stres prenatalny nie obniżył zawartości żadnego spośród trzech kluczowych enzymów zaangażowanych w ten proces, a odwrotnie poziom najważniejszego enzymu glikolizy: fosfofruktokinazy I ulegał podwyższeniu u szczurów stresowanych prenatalnie po stresie

ostrym w obydwu strukturach mózgu. Wykazano również istotne zwiększenie zawartości L-mleczanu w korze czołowej u zwierząt stresowanych prenatalnie i poddanych dodatkowym czynnikom stresowym.

Wpływ stresu prenatalnego na cykl Krebsa i fosforylację oksydacyjną był uzależniony od struktury mózgu - w korze czołowej stres ostry i obciążenie glukozą zwiększało poziom dehydrogenazy pirogronianowej, natomiast w hipokampie stężenie tego enzymu było obniżone w grupie stresowanej po podaniu glukozy. W hipokampie obserwowano również zmniejszenie aktywności kompleksu IV oksydazy cytochromu c, przy jednoczesnym braku efektu stresu na aktywność tego enzymu w korze czołowej.

W kolejnym etapie badań wykazano, że w przeciwieństwie do zmian na obwodzie, stres prenatalny nie zmienia poziomu insuliny w korze czołowej i hipokampie. Również nie obserwowano zmian w ekspresji aktywnej formy receptora insuliny w korze czołowej a w hipokampie spadek fosforylacji receptora insuliny wystąpił jedynie u zwierząt stresowanych prenatalnie otrzymujących glukozę. Stres prenatalny wywierał najsilniejszy efekt na działanie insuliny w podwzgórzu, obniżając stymulowany podaniem glukozy wzrost poziomu tego hormonu oraz zwiększając fosforylację receptora insuliny pod wpływem dodatkowych bodźców. Stres prenatalny, stres ostry i obciążenie glukozą wpłynęły silnie na ekspresję receptora GLP-1 w hipokampie, istotnie obniżając jego stężenie w tej strukturze mózgu.

Przeprowadzone badania wykazały, że stres w okresie prenatalnym w trwały sposób zmienia niektóre procesy zaangażowane w metabolizm węglowodanów w mózgu szczurów. Przede wszystkim stres prenatalny działa jednak, jako czynnik warunkujący, zmieniający wrażliwość tkanki mózgowej na czynniki stresowe działające u dorosłych zwierząt. W korze czołowej stres prenatalny nasila głównie efekty stresu ostrego, natomiast w hipokampie w większym stopniu wpływa na zmiany obserwowane po podaniu glukozy. Wyniki te popierają teorię, że stres w okresie prenatalnym warunkuje odpowiedź organizmu na szereg niekorzystnych czynników działających w późniejszych etapach życia osobniczego i rozszerzają ją o fakt, że dotyczy to również regulacji procesów metabolicznych w mózgu.

Zmiany w badanych markerach metabolicznych wykazane u zwierząt prenatalnie stresowanych wskazują, że w tym modelu depresji dochodzi do zwiększenia poziomu glukozy i glikogenu, nasilenia transportu glukozy oraz procesu glikolizy zarówno w hipokampie jak i korze czołowej, natomiast dalsze etapy metabolizmu węglowodanów w

hipokampie ulegają obniżeniu, podczas gdy w korze czołowej cykl Krebsa wydaje się być nasilony a proces fosforylacji oksydacyjnej nie ulega zmianie. Wyniki te sugerują, że nasilenie wychwytu glukozy i procesu glikolizy w hipokampie może być mechanizmem kompensującym niedobory energetyczne związane z osłabieniem procesu fosforylacji oksydacyjnej. Zmiany obserwowane w hormonach zaangażowanych w regulację metabolizmu i plastyczności neuronalnej wskazują, że obserwowane w stresie prenatalnym obniżenie ekspresji receptora GLP-1 w hipokampie może odpowiadać nie tylko za zmiany metaboliczne, lecz również często wykazywane w tym modelu depresji upośledzenie funkcji kognitywnych, natomiast obniżenie indukowanego glukozą poziomu insuliny w podwzgórzu może być związane z obwodową hiperglikemią.

Na obecnym etapie wiedzy trudno jest jednak jednoznacznie ocenić fizjologiczne konsekwencje obserwowanych w obecnych badaniach zmian. Wynika to głównie z faktu, że w centralnym systemie nerwowym poszczególne etapy metabolizmu węglowodanów zachodzą w różnych typach komórek a enzymy i hormony regulujące metabolizm oprócz działania metabolicznego wpływają na inne funkcje komórek w tym plastyczność synaptyczną i procesy przeżycia. Istotnym ograniczeniem w interpretacji uzyskanych wyników pod kątem udziału zmian metabolicznych w mózgu w patogenezie depresji jest fakt, że badania prowadzone były tylko w jednym zwierzęcym modelu depresji a dane literaturowe dotyczące mózgowych zmian metabolicznych u ludzi cierpiących na depresję czy w innych modelach depresji są na razie bardzo fragmentaryczne.

Summary:

Depression is a mental illness with a complex but still poorly understood etiology. Many clinical and experimental data indicates that the excessive effect of glucocorticoids resulting from the dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) is an important factor in the pathogenesis of this disease. Moreover, the results of numerous studies show that chronic exposure to elevated glucocorticoid level leads not only to the occurrence of many morphological, physiological and functional changes in the central nervous system, characteristic for depressed patients, but also significantly increases the likelihood of the development of metabolic disorders, particularly type II diabetes mellitus. Despite the rather well-documented effect of glucocorticoids on peripheral glucose metabolism, little attention has been given to their effects on carbohydrate metabolism in the central nervous system. The brain, as an organ with high metabolic activity, requires constant access of glucose as an energy source, therefore any abnormalities in its consumption may result in serious changes in the functioning of nerve cells that may underlie the development of depression.

The aim of the study was to determine whether prenatal stress in rats (animal model of depression) may affect brain glucose and glycogen concentration, glucose transport, glycolysis, Krebs cycle, oxidative phosphorylation, pentose phosphate pathway, as well as the action of hormones regulating glucose metabolism: insulin and glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Selected metabolic markers were determined in the frontal cortex and hippocampus, i.e. structures in which changes in depression are mainly observed and insulin and GLP-1 were also assayed in the hypothalamus, a region of the brain involved in the central regulation of body energy homeostasis. In order to investigate whether prenatal stress can alter the response to other adverse stimuli in adult life, the studied factors were determined both in basic conditions as well as in animals subjected to acute stress and glucose administration.

The studies were conducted on rats of Sprague-Dawley strain. Pregnant female rats were subjected to three daily immobility stress sessions from the fourteenth day of pregnancy till delivery. After 3 months, young male offspring of stressed mothers and control females underwent forced swimming test in order to verify the applied model of depression. The next day, some of the control and prenatally stressed rats were subjected to acute stress (immobility stress, 1 hour). Half of the animals from all experimental groups were given glucose (1 g / kg, oral). Two hours after glucose loading, the animals

were killed by decapitation and then blood and brain structures were isolated. Glucose, glycogen and glycolysis metabolites (pyruvate and L-lactate) in the frontal cortex and hippocampus were measured using fluorimetric assays. Concentrations of glucose transporters, glycolysis and Krebs cycle enzymes as well as the content of insulin, GLP-1, their receptors and corticosterone were determined with ELISA method. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and cytochrome c oxidase IV complex was determined by the colorimetric method.

Prenatal stress evoked depression-like changes in rats, which were manifested by prolonged immobility time, simultaneously decreasing swimming time and climbing time in the forced swimming test. Prenatally stressed animals were characterized by an increased glucose content both in the blood plasma and the hippocampus as well as increased glycogen accumulation in the frontal cortex. These changes were visible both in basal conditions and under the influence of additional stress factors. It was also shown that the increased amount of glucose and glycogen in the examined structures may be caused by increased expression of glucose transporting proteins, particularly GLUT1, whose level was significantly higher in prenatally stress animals subjected to additional acute stress.

In subsequent studies, it was found that the increase in glucose and glycogen levels in brain structures did not result from the weakening of glycolysis, since prenatal stress did not lower the content of any of the three key enzymes involved in this process, and conversely the level of the most important glycolytic enzyme: phosphofruktokinase-1 was increased in rats stress prenatally after acute stress in both brain structures. A significant increase in the content of L-lactate in the frontal cortex was also demonstrated in pre-stressed animals subjected to additional stress factors.

The effect of prenatal stress on the Krebs cycle and oxidative phosphorylation depended on the brain structure - in the frontal cortex, acute stress and glucose loading increased pyruvate dehydrogenase levels, whereas in the hippocampus the concentration of this enzyme was reduced in the group stressed after glucose administration. In the hippocampus a decrease in the activity of complex IV cytochrome c oxidase was also observed, with no effect of stress on the activity of this enzyme in the frontal cortex.

In the next stage of the study, it was shown that in contrast to changes in the periphery, prenatal stress does not alter the level of insulin in the frontal cortex and hippocampus. Also, no changes were observed in the expression of the active form of the

insulin receptor in the frontal cortex and in the hippocampus the decline in insulin receptor phosphorylation occurred only in animals stressed prenatally receiving glucose. Prenatal stress exerted the strongest effect on the action of insulin in the hypothalamus, reducing the glucose stimulated increase in the level of this hormone and increasing phosphorylation of the insulin receptor under the influence of additional stimuli. Prenatal stress, acute stress and glucose loading strongly affected the expression of the GLP-1 receptor in the hippocampus, significantly decreasing its concentration in this brain structure.

Our studies have shown that stress in the prenatal period permanently alters some of the processes involved in carbohydrate metabolism in the rat brain. Above all, prenatal stress was shown to work as a preconditioning factor, changing the sensitivity of brain tissue to stress factors acting in adult animals. In the frontal cortex, prenatal stress intensifies mainly the effects of acute stress, whereas in the hippocampus it has a greater influence on the changes observed after glucose administration. These results support the theory that stress in the prenatal period determines the body's response to a number of adverse factors acting later in life, extending it with a fact that it also concerns the regulation of metabolic processes in the brain.

Alterations in the metabolic markers tested in prenatally stress animals indicate that in this model of depression glucose and glycogen levels, glucose transport and glycolysis are increased in both the hippocampus and frontal cortex, while further stages of carbohydrate metabolism in the hippocampus decrease, whereas in the frontal cortex the Krebs cycle appears to be intensified and the oxidative phosphorylation process does not change. These results suggest that enhancement of glucose uptake and glycolysis in the hippocampus may be a mechanism compensating for energy deficiencies associated with the weakening of the oxidative phosphorylation process. The changes observed in hormones involved in the regulation of metabolism and neuronal plasticity indicate that the reduction of GLP-1 receptor expression in the hippocampus observed in prenatal stress may not only be responsible for metabolic changes, but also the depression of cognitive functions often exhibited in this model of depression, while the reduction of glucose induced insulin levels in the hypothalamus may be associated with peripheral hyperglycaemia.

At the current stage of knowledge, however, it is difficult to unequivocally assess the physiological consequences of the changes observed in the current work. This is

mainly due to the fact that in the central nervous system, the various stages of carbohydrate metabolism occur in various cell types, and the metabolism-regulating enzymes and hormones in addition to metabolic activity affect other cell functions including synaptic plasticity and survival processes. An important limitation in the interpretation of the obtained results in terms of the metabolic changes in the brain in the pathogenesis of depression is the fact that studies were conducted only in one animal model of depression and literature data concerning cerebral metabolic changes in people suffering from depression or other models of depression are very fragmentary.