

mgr Katarzyna Głombik (Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej)

promotorzy: prof. Agnieszka Basta-Kaim, prof. Rafał Olszanecki

recenzenci: prof. Ewa Obuchowicz, prof. Stanisław Czuczwar

temat rozprawy: *Wpływ leków przeciwdepresyjnych na działanie insuliny w wybranych strukturach mózgu w zwierzęcym modelu przypominającym depresję*

Streszczenie

Depresja to choroba afektywna, o złożonym obrazie klinicznym, charakteryzująca się zaburzeniami nastroju oraz stanu emocjonalnego, której etiologia pomimo wielu lat badań nie została do końca wyjaśniona. Obecnie coraz częściej sugeruje się, że zaburzenia metaboliczne mogą leżeć u podłoża zachorowań na depresję. Obserwacje te pozostają w zgodzie z danymi epidemiologicznymi wskazującymi, że choroby metaboliczne, w tym cukrzyca, prowadzą do pojawiania się epizodów depresyjnych, a z drugiej strony chorzy na depresję częściej zapadają na cukrzycę. Wstępne dane ostatnich lat pokazały, że nie tylko na obwodzie, ale także w ośrodkowym układzie nerwowym dochodzić może do osłabienia działania insuliny, zaburzeń w przemianach glukozy i glikogenu w mózgu oraz nasilenia zmian neurodegeneracyjnych. Jednocześnie dotychczasowe badania, prowadzone głównie na obwodzie, dotyczące wpływu leków przeciwdepresyjnych na szlaki metaboliczne, w tym szlak związany z działaniem insuliny, jak i potencjalna możliwość stosowania tej grupy leków w terapii wspomagającej chorób metabolicznych są niejednoznaczne i niewystarczające.

Z tego powodu w niniejszej rozprawie oceniono wpływu stresu prenatalnego (zwierzęcy model depresji) na ścieżkę sygnałową związaną z insuliną, a także określenie jej regulacji poprzez chroniczne podania leków przeciwdepresyjnych (imipraminy, fluoksetyny, tianeptyny), w obszarach mózgu szczególnie zaangażowanych w patofizjologię depresji (kora czołowa oraz hipokamp).

Badania prowadzono w modelu stresu prenatalnego, który jest uznanym i opisanym zwierzęcym modelem przypominającym depresję. Ciężarne samice szczurów szczepu Sprague-Dawley poddawano stresowi unieruchomienia oraz oświetlano silnym

światłem (trzy razy dziennie po 45 minut) od 14 dnia ciąży do dnia porodu. Doświadczenia prowadzono na 3-miesięcznych samcach szczurów – potomstwie matek stresowanych oraz kontrolnych, zarówno bez jak i po chronicznych, 21-dniowych podaniach leków przeciwdepresyjnych o różnym mechanizmie działania. Zastosowano: trójcykliczny lek przeciwdepresyjny – imipraminę, selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny - fluoksetynę oraz lek nietypowy – tianeptynę.

Przeprowadzając weryfikację behawioralną modelu- w teście preferencji spożycia 1% roztworu cukru- wykazano niechęć do picia słodkiej wody u dorosłych, prenatalnie stresowanych samców, co świadczy o anhedonii. Natomiast w teście wymuszonego pływania (zmodyfikowany test Porsolta) obserwowano wydłużenie czasu bezruchu, przy jednoczesnym skróceniu czasu pływania oraz wspinania, u zwierząt po stresie prenatalnym w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Zmiany w zachowaniu obserwowane w zmodyfikowanym teście Porsolta normalizowały chroniczne podania leków przeciwdepresyjnych.

Oprócz testów behawioralnych wykonano także badania elektrofizjologiczne, które pokazały obniżenie poziomu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) w hipokampie oraz korze czołowej, w której wykazano także nasilenie transmisji glutaminianergicznej u dorosłego potomstwa matek stresowanych w ciąży.

W kolejnych etapach pracy prowadzono badania biochemiczne metodami: real-time PCR, ELISA i Western blot, a także z wykorzystaniem techniki proteomiki różnicowej (dwuwymiarowa elektroforeza połączona z tandemową spektrometrią mas), w homogenatach kory czołowej oraz hipokampa.

Uzyskane wyniki nie wykazały wpływu stresu prenatalnego oraz chronicznych podań leków przeciwdepresyjnych na ekspresję mRNA i poziom insuliny oraz całkowity poziom receptora insulinowego (IR) w obu badanych strukturach. Stwierdzono natomiast, że zarówno w korze czołowej jak i hipokampie procedura stresu prenatalnego istotnie statystycznie obniżyła poziom ufosforylowanej (aktywnej), wewnątrzkomórkowej podjednostki β receptora insulinowego, a podania leków przeciwdepresyjnych miały normalizujący wpływ.

Ze względu na to, że aktywność biologiczna receptora insulinowego regulowana jest głównie przez białka substratowe (IRS-1 oraz IRS-2) oraz adaptorowe (Shc1 oraz Grb2), w kolejnych badaniach oceniono wpływ stresu i podań leków na ekspresję mRNA oraz poziom tych białek. Wykazano wzrost poziomu fosforylacji seryny, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu fosforylacji tyrozyny, substratu receptora insulinowego (IRS-1) w korze czołowej. Wszystkie zastosowane leki przeciwdepresyjne normalizowały obie badane zmiany w fosforylacji IRS-1, a tianeptyna podnosiła także, obniżony pod wpływem stresu, poziom IRS-2 w korze czołowej. Natomiast w hipokampie zwierząt po stresie prenatalnym stwierdzono spadek ekspresji białka adaptorowego Shc1, który normalizowały podania wszystkich leków przeciwdepresyjnych. Równolegle, zarówno w korze czołowej jak i hipokampie, wykazano niższy poziom białka adaptorowego Grb2 u zwierząt prenatalnie stresowanych.

Badania ostatnich lat sugerują związek zmian w insulinowej ścieżce sygnałowej z dysfunkcjami mitochondrialnymi, dlatego też w kolejnym etapie pracy oceniono wpływ stresu prenatalnego i podań leków przeciwdepresyjnych na: białko biogenezy mitochondriów PGC-1 α , białko proapoptotyczne Bax oraz przeciwapoptotyczne Bcl-2 w homogenatach obu struktur mózgu. W modelu stresu prenatalnego wykazano spadek ekspresji PGC1- α w korze czołowej i hipokampie oraz wzrost ekspresji białka Bax w korze czołowej. Leki przeciwdepresyjne w zróżnicowany sposób modulowały te czynniki.

W niniejszej pracy po raz pierwszy zastosowano także strategię proteomicznej analizy różnicowej - do określenia zmian w ekspresji białek mitochondriów kory czołowej oraz hipokampa- w zwierzęcym modelu przypominającym depresję oraz do oceny wpływu chronicznych podań leków przeciwdepresyjnych. Wykazano, że stres prenatalny w zróżnicowany, zależny od badanej struktury sposób, zmienia profil białek mitochondrialnych związanych między innymi z biogenezą mitochondriów, enzymami łańcucha oddechowego czy stresem oksydacyjnym. Również chroniczne podania leków przeciwdepresyjnych powodowały złożone zmiany białek mitochondrialnych, którymi zależały od zastosowanego leku oraz analizowanej struktury mózgu. Niektóre ze stwierdzonych zmian w białkach mitochondrialnych kory czołowej oraz hipokampa opisano po raz pierwszy, część z nich wiązać można jak się wydaje ze ścieżką

insulinową, inne mogą stanowić podłoże do dalszych badań podstaw zaburzeń depresyjnych. Co więcej chroniczne podania imipraminy, fluoksetyny lub tianepetyny normalizowały większość wywołanych stresem prenatalnym zmian w profilu białek mitochondrialnych, wskazując na nowy potencjał tych leków w regulacji zaburzeń metabolicznych w zwierzęcym modelu depresji.

Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania wykazały wpływ procedury stresu prenatalnego na zaburzenia w mózgowej ścieżce sygnałowej związanej z insuliną, na proces biogenezy oraz ekspresję białek związanych z mitochondriami kory czołowej i hipokampa. Wydaje się prawdopodobne, iż u podstaw normalizującego wpływu leków przeciwdepresyjnych na zaburzenia behawioralne, obserwowane w zwierzęcym modelu depresji, może leżeć ich wpływ na dysfunkcje metaboliczne związane ze ścieżką insulinową oraz zmianami białek w mitochondriach kory czołowej i hipokampa.