

Mgr Joanna Wabno

*„Badanie wpływu imipraminy i kortykosteronu na przekaznictwo
glutaminianergiczne i GABAergiczne w korze czołowej mózgu szczurów”*

Promotor: prof. dr hab. Grzegorz Hess

Recenzenci: prof. dr hab. Władysław Lasoń,
prof. dr hab. Jan Konopacki

Streszczenie

Szacuje się, że obecnie na depresję może chorować 19% populacji, a z raportów WHO wynika, że do 2030 roku choroby afektywne, w tym depresja, znajdą się na drugim miejscu listy schorzeń, prowadzących do przedwczesnej śmierci. Ponadto stosowane obecnie terapie przeciwdepresyjne nie są w pełni satysfakcjonujące ze względu na brak pełnej skuteczności a ponadto cechuje je wiele niekorzystnych efektów ubocznych. W dużej mierze jest to skutkiem niepełnej wiedzy na temat neurobiologicznego podłoża depresji.

Stany emocjonalne i procesy motywacyjne, których zaburzenia obserwuje się w chorobach afektywnych, regulowane są przez układ limbiczny. System ten połączony jest z korą mózgową, w której następuje integracja stanów emocjonalnych z procesami poznawczymi. Dodatkowo kora czołowa odpowiada za pamięć operacyjną, funkcje poznawcze i motorykę. W obszarze tym dochodzi do funkcjonalnych i strukturalnych zmian w stanach depresyjnych.

Oś podwzgórze - przysadka mózgowa - nadnercza (PPN) reguluje wydzielanie glukokortykoidów. Aktywacja osi PPN następuje w wyniku stresu, wyzwalając reakcję organizmu na bodźce stresowe pochodzące ze środowiska zewnętrznego lub wewnętrznego. Układ ten podlega regulacji na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Do najważniejszych glukokortykoidów, produkowanych przez korę nadnerczy, należą kortykosteron i kortyzol, wywierające swoje efekty na poziomie komórkowym za pośrednictwem receptorów mineralokortykoidowych (MR) i glukokortykoidowych (GR).

Powtarzające się oddziaływanie czynnika stresującego powoduje stale utrzymujące się, podwyższenie poziomu glukokortykoidów w organizmie. Może prowadzić to do rozregulowania osi PPN, poprzez zaburzenie mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego. Istnieje wiele dowodów świadczących o udziale zaburzeń funkcji osi PPN w patomechanizmie depresji. Fenotyp depresyjny wykazują także zwierzęta otrzymujące egzogeny kortykosteron. Z tego powodu wielokrotne podania glukokortykoidów stanowią jeden ze zwierzęcych modeli nieadaptowalnego stresu.

Podawanie zwierzęciu kortykosteronu pozwala wyeliminować adaptację do wielokrotnie powtarzanego bodźca.

Badania ostatnich lat pokazują, że kluczową rolę w etiologii i terapii depresji może odgrywać kwas glutaminowy i γ -aminomasłowy będące, odpowiednio, podstawowym neuroprzekaźnikiem pobudzającym i hamującym w mózgu ssaków. Jednak, jak dotąd, nie ma pełnych danych dotyczących zmian w zakresie tych dwóch układów neuroprzekaźników na poziomie synaps, które zachodzą pod wpływem podań leków przeciwdepresyjnych oraz w rezultacie chronicznie podniesionego poziomu kortykosteronu, jako czynnika prodepresyjnego. Dlatego w niniejszej pracy postawiono sobie za cel z jednej strony zbadanie wpływu podań trójcyklicznego leku przeciwdepresyjnego, imipraminy, a z drugiej – podań kortykosteronu, jako zwierzęcego modelu nieadaptowalnego stresu, na przekąźnictwo glutaminianergiczne i GABAergiczne w korze czołowej szczura.

Samce szczurów rasy Wistar otrzymywały sondą doprzętykową imipraminę w dawce 10 mg/kg masy ciała przez 14 dni. Szczurom kontrolnym podawana była woda. Kolejną grupę stanowiły zwierzęta, którym podawano dootrzewnowo kortykosteron w dawce 10 mg/kg przez 7, 14 lub 21 dni. Zwierzęta kontrolne otrzymywały rozpuszczalnik, Tween 80. Dodatkowo postanowiono zbadać, czy podania leku przeciwdepresyjnego odwrócą zmiany wywołane kortykosteronem. Po 7 dniach iniekcji kortykosteronu, rozpoczęto jednoczesne podania tego glukokortykoidu z imipraminą i kontynuowano je przez 14 kolejnych dni.

Doświadczenia elektrofizjologiczne przeprowadzano na skrawkach mózgu, zawierających obszar kory czołowej. Technika *whole-cell patch-clamp* z komórek piramidowych II/III warstwy kory rejestrowano spontaniczne postsynaptyczne prądy pobudzające (sEPSC) i spontaniczne postsynaptyczne prądy hamujące (sIPSC). Mierzono pobudliwość błony komórkowej neuronów oraz częstotliwość, amplitudę, czas narastania i stałą czasową zanikania sEPSC i sIPSC. Dodatkowo metodą biochemiczną (Western blot), oznaczono ilość wybranych podjednostek receptorów: AMPA (GluR1 i GluR2), NMDA (NR1, NR2A i NR2B) i GABA_A (α_1 , β_2 i γ_2). W celu zbadania, czy po podaniach imipraminy zmianom ulega modulacja uwalniania neuroprzekaźników przez presynaptyczne metabotropowe receptory dla kwasu glutaminowego mGlu7, zwierzętom podawano imipraminę przez okres 14 dni, a następnie na skrawki kory czołowej aplikowano agonistę mGluR7 – AMN082 i rejestrowano sEPSC i sIPSC.

Przeprowadzone pomiary wykazały, iż podstawowe właściwości błony komórkowej badanych neuronów nie różniły się pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi. Podania jednokrotne, zarówno leku przeciwdepresyjnego, jak i kortykosteronu, nie miały wpływu na żaden z parametrów charakteryzujących prądy pobudzające i hamujące. Doświadczenia pokazały, że czternastodniowe podania imipraminy obniżają częstotliwość sEPSC i sIPSC oraz

zwiększają amplitudę sIPSC. Czas narastania i stała czasowa zanikania rejestrowanych prądów postsynaptycznych nie uległy zmianie. Wielokrotne podania kortykosteronu zwiększały częstotliwość sEPSC, pozostając bez wpływu na przekąźnictwo hamujące. Po 7 i 21 dniach podań kortykosteronu zaobserwowano niewielkie skrócenie czasu narastania sEPSC. Po 7 i 14 dniach podań kortykosteronu stwierdzono niewielkie skrócenie stałej czasowej zanikania sEPSC. Imipramina w dawce 10 mg/kg masy ciała nie odwracała zmian częstotliwości sEPSC, wywołanych podaniami kortykosteronu.

Nie stwierdzono zmian poziomu ekspresji podjednostki GluR1 w żadnej z grup doświadczalnych, natomiast w przypadku GluR2 zaobserwowano wzrost w grupie zwierząt otrzymujących imipraminę. Ekspresja NR1 i NR2A nie uległa zmianie w żadnej z grup, a ekspresja NR2B spadła u zwierząt poddanych wielokrotnemu działaniu imipraminy. Ponadto 14 dniowe podania tego leku spowodowały spadek poziomu białka podjednostek α_1 , β_2 i γ_2 receptora GABA_A.

W grupie kontrolnej, której przez 2 tygodnie podawana była woda, podania na skrawek związku AMN 082 wywołały wzrost częstotliwości sEPSC, nie wpływając na częstotliwość sIPSC. 14 dniowe podania imipraminy spowodowały zahamowanie wpływu agonisty mGluR7 na częstotliwość sEPSC oraz obniżenie częstotliwości sIPSC.

W przeprowadzanych eksperymentach pokazano hamujący wpływ wielokrotnych podań imipraminy na transmisję glutaminianergiczną i GABAergiczną oraz nasilający wpływ wielokrotnych podań kortykosteronu na przekąźnictwo glutaminianergiczne przy braku wpływu na przekąźnictwo GABAergiczne. Wyniki te wskazują na wybiórcze działanie kortykosteronu na przekąźnictwo glutaminianergiczne w korze czołowej szczura. Ponieważ eksperymenty przeprowadzano 48 godzin po ostatnim podaniu związku, obserwowane efekty nie są, najprawdopodobniej, wynikiem bezpośredniego działania kortykosteronu, bądź imipraminy na funkcje neuronów lecz wynikają ze zmian adaptacyjnych będących efektem długotrwałej ekspozycji zwierząt na badane związki.

W niniejszej pracy pokazano również, że podania imipraminy w dawce 10 mg/kg nie odwracają efektów wpływu wielokrotnych podań kortykosteronu na spontaniczne postsynaptyczne prądy pobudzające. Świadczy to tym, że w przypadku obydwu substancji mamy do czynienia z odmiennymi mechanizmami regulacji transmisji glutaminianergicznej.

Receptory mGluR7 modulują uwalnianie zarówno kwasu glutaminowego, jak i γ -aminomasłowego. Zmiany w regulacji transmisji glutaminianergicznej i GABAergicznej przez mGluR7 po wielokrotnych podaniach imipraminy mogą świadczyć o tym, że terapie przeciwdepresyjne przywracają w korze mózgowej równowagę w poziomie neuroprzekąźnictwa

pobudzającego i hamującego. Na to wskazują także zmiany w ilości niektórych podjednostek receptorów dla Glu i GABA pod wpływem 14 dniowych podań imipraminy.