

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

Wpływ jonów magnezu na układ glutaminianergiczny w zwierzęcych modelach depresji

Mgr Bartłomiej Pochwat

Kraków 2014

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Gabriel Nowak

Promotor pomocniczy: dr Bernadeta Szewczyk

Katedra Farmakobiologii

Praca została wykonana
w Pracowni Badań Radioreceptorowych Katedry Farmakologii Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego

oraz

Zakładzie Neurobiologii Instytutu Farmakologii PAN

Praca doktorska została zrealizowana w ramach:

***Projektu „De-Me-Ter”, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu
Rozwoju Regionalnego, nr.POIG.01.02-12-004/09***

oraz

***Programu POMOST Fundacji na rzecz Nauki Polskiej współfinansowanego ze środków Unii
Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Program Operacyjny
Innowacyjna Gospodarka. Projekt nr: POMOST/2012-6/12 „Involvement of ZnT-1, ZnT-3, ZnT-4,
ZnT-5, ZnT-6 and MT-3 in the pathophysiology and treatment of depression”***



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Fundacja na rzecz Nauki Polskiej

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Składam najserdeczniejsze podziękowania mojemu promotorowi Panu Prof. dr hab. Gabrielowi Nowakowi za udzielenie cennych wskazówek przy pisaniu tej rozprawy oraz koordynowanie wszystkich prowadzonych badań.

**Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania Pani
Dr Bernadecie Szewczyk za bezcenne wskazówki w pracy
laboratoryjnej, merytoryczne konsultacje i cierpliwość bez
których ta praca nigdy by nie powstała.**

Spis treści

1. Wprowadzenie.....	1
1.1 Farmakoterapia depresji.....	1
1.2 Receptory glutaminianowe.....	5
1.3 Receptory NMDA – budowa i charakterystyka biologiczna.....	6
1.4 Receptory AMPA – budowa i charakterystyka biologiczna.....	10
1.5 Przeciwdepresyjny mechanizm działania antagonistów NMDA.....	13
1.6 Antagoniści receptora NMDA w badaniach klinicznych i przedklinicznych.....	17
1.7 Magnez w chorobach afektywnych.....	19
1.8 Metalotioneiny a choroby ośrodkowego układu nerwowego.....	20
2. Cel pracy.....	23
3. Materiały i metody.....	25
3.1 Model chronicznego łagodnego stresu.....	25
3.2 Model bulbektomii.....	27
3.3 Oznaczanie poziomu białka – metoda western blotting.....	30
3.4 Oznaczanie poziomu białka – RT-PCR.....	33
3.5 Oznaczanie poziomu magnezu w surowicy.....	37
4. Chroniczny łagodny stres – opracowanie wyników.....	38
4.1 Badania behawioralne – chroniczny łagodny stres.....	38
4.2 Badania biochemiczne – chroniczny łagodny stres.....	40
5. Bulbektomia – opracowanie wyników.....	51
5.1 Badania behawioralne – bulbektomia.....	51
5.2 Badania biochemiczne – bulbektomia.....	53

6. Dyskusja wyników.....	63
6.1 Dyskusja wyników – chroniczny łagodny stres.....	63
6.2 Dyskusja wyników – bulbektomia.....	75
7. Zakończenie.....	85
7.1 Podsumowanie.....	85
7.2 Wnioski.....	86
7.3 Streszczenie.....	87
7.4 Abstract.....	89
7.5 Piśmiennictwo.....	91

Skorowidz skrótów

Skorowidz skrótów używanych w pracy

AMPA – kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowy

BDNF – Neurotrofowy czynnik pochodzenia mózgowego

CaMKII – zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny kinaza białkowa II

CGP 37849 – kwas (E)-2-amino-4-metylo-5-fosfono-walerianowy

FST – test wymuszonego pływania

GABA – kwas γ -aminomasłowy

GAD-65 – dekarboksylaza kwasu glutaminowego 65

GAD-67 – dekarboksylaza kwasu glutaminowego 67

GKAP – białko sprzężone z cyklozą guanylową

GLYX-13 – treonina-prolina-prolina-treonina- NH_2

IMAO-A – inhibitory monoaminooksydazy A

L-701,324 - 7-Chloro-4-hydroksy-3-(3-phenoksy)fenylo-2(1*H*)-quinolinon

LTD – długotrwałe wygaszanie synaptyczne

LTP – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne

MK-801 – (5*S*,10*R*)-(+)-5-Metylo-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyklohepteno-5,10-imina

MT-1,2,3 – metalotioneiny 1,2,3

NMDA – kwas N-metylo-D-asparginowy

NRI – inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny

OB – bulbektomia

Oś HPA – oś podwzgórze - przysadka mózgowa – nadnercza

PFC – kora przedczołowa

PKA – kinaza białkowa A

PKC – kinaza białkowa C

P-S831 – fosforylacja seryny 831 podjednostki GluA1 receptora AMPA

Skorowidz skrótów

P-S845 – fosforylacja seryny 845 podjednostki GluA1 receptora AMPA

PSD-95 – białko gęstości synaptycznej 95

Ro-6981 -- ($\alpha R, \beta S$)- α -(4-Hydroksyfenylo)- β -metylo-4-(fenylmetylo)-1-piperydynopropanol

S-831 – seryna 831 podjednostki GluA1 receptora AMPA

S-845 – seryna 845 podjednostki GluA1 receptora AMPA

SNRI – inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny

SSRI – selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny

TLPD – trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne

Rozdział 1

Wprowadzenie

1.1 Farmakoterapia depresji

Obok nowotworów oraz schorzeń układu krążenia depresja jest jedną z najdotkliwszych chorób trapiących współczesne społeczeństwa. Szacuje się, że kilkanaście procent populacji zmaga się z depresją bądź spowodowanymi przez stres zaburzeniami nastroju (Wittchen i wsp. 2011). O wadze problemu świadczy także fakt, że schorzeniem tym dotknięci są ludzie należący do każdej kategorii wiekowej, zaczynając od dzieci, a na ludziach starych kończąc (Blumberg i Izard. 1986; Gatz i Hurwicz. 1990). Depresja nie tylko jest problemem dla każdej cierpiącej z jej powodu jednostki, lecz równocześnie stanowi bardzo poważny problem społeczny odpowiadający za generowanie dużych kosztów ekonomicznych (Wang i wsp. 2003; Cuijpers i wsp. 2007).

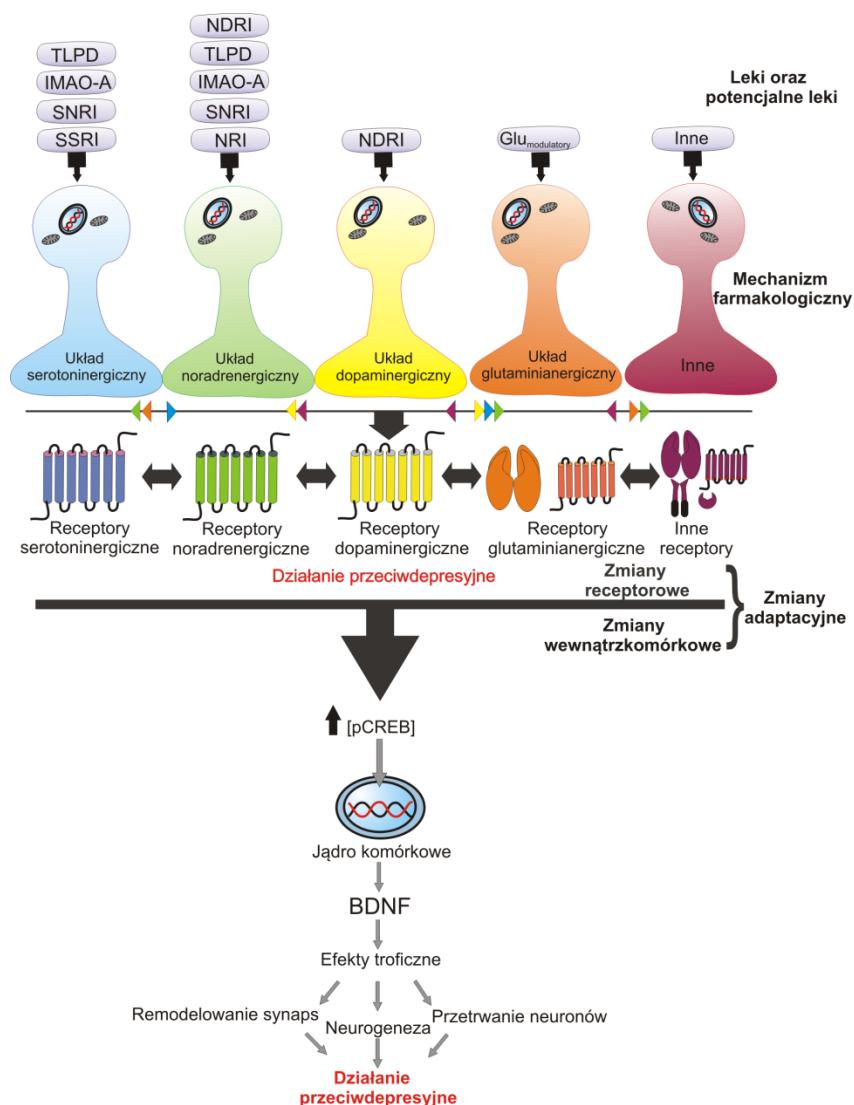
Niestety pomimo znaczącego postępu farmakoterapeutycznych metod leczenia rozwiązanie problemu depresji z medycznego punktu widzenia wydaje się nadal bardzo odległe. Na przestrzeni lat wypracowano szereg możliwości farmakoterapeutycznych opartych na lekach o zróżnicowanym mechanizmie działania. Niemniej owo zróżnicowanie mechanizmu działania poszczególnych leków jest dosyć wąskie, ponieważ jest zrelatywizowane głównie w stosunku do układu monoamin. Termin ten desygnuje około dwadzieścia różnych związków o charakterze aminowym. W kontekście leczenia zaburzeń nastroju kluczową rolę odgrywają trzy z nich: serotonina, noradrenalina i dopamina. Tym samym mechanizmy działania istotnych klinicznie leków przeciwdepresyjnych różnią się od siebie przede wszystkim stopniem oddziaływania na układ konkretnej aminy oraz molekularnym punktem uchwytu. Jeżeli za główne kryterium podziału uznać molekularny punkt uchwytu, to leki przeciwdepresyjne są zazwyczaj inhibitorami enzymów rozkładających monoaminy bądź inhibitorami transporterów monoamin znajdujących się w synapsie i odpowiadających za zwrotny wychwyt tych neuroprzekaźników ze szczeliny synaptycznej do wnętrza komórki. Dlatego też nie dziwi fakt, że leki obecnie stosowane w leczeniu depresji to

najczęściej selektywne inhibitory wychwyty noradrenaliny i/lub serotoniny, rzadziej dopaminy. Nieco mniejsze kliniczne znaczenie mają inhibitory monoaminoooksydazy-A (IMAO-A), mitochondrialnego enzymu rozkładającego omawiane tu aminowe pochodne oraz trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, których molekularny mechanizm działania oprócz blokowania synaptycznych transporterów noradrenaliny czy serotoniny związany jest z pobudzaniem bądź blokowaniem licznych receptorów dla wielu neuroprzekaźników (Heninger i wsp. 1996; Charney. 1998; Stahl. 2008; Stahl. 2009).

Nietrudno dostrzec, że zarówno blokada enzymatycznego rozkładu monoamin, jak i zapobieganie wychytowi tych cząsteczek ze szczeliny synaptycznej sprzyjają zwiększonemu stężeniu tych związków w synapsie bądź komórce nerwowej. Powyższa obserwacja, która wskazuje na terapeutyczne znaczenie synaptycznego wzrostu stężenia monoamin, posłużyła swego czasu za pierwotną przesłankę w sformułowaniu monoaminowej teorii depresji w jej podstawowej postaci. W najbardziej rudymenarnym ujęciu teoria ta wskazywała na redukcję stężenia neuroprzekaźników monoaminowych w newralgicznych rejonach mózgu odpowiedzialnych za procesy poznawcze i emocjonalne, takich jak kora przedczołowa, hipokamp czy ciało migdałowe. W myśl tych teoretycznych założeń rolą leków przeciwdepresyjnych jest normalizacja zaburzonych parametrów do odpowiednich wartości fizjologicznych (Stahl. 2008; Stahl. 2009).

Niestety mimo niewątpliwych terapeutycznych sukcesów w zwalczaniu depresji, jakie daje zastosowanie dostępnych na rynku farmaceutyków, od lat pozostają nierozwiązane dwie niedogodności, które dotyczą bezpośrednio chorych, a pośrednio lekarzy. Wszelkie leki przeciwdepresyjne zaliczane do opisanych uprzednio grup wywołują szereg działań niepożądanych oraz charakteryzują się opóźnionym o kilka tygodni początkiem działania. Z praktycznego punktu widzenia sytuacja ta znacząco komplikuje współpracę pomiędzy pacjentem a lekarzem, utrudniając terapię dostępnymi metodami. Równocześnie owa znacząca niedogodność stała się bodźcem do rozpoczęcia dalszych badań nad biologicznym podłożem depresji. Doprowadziło to do modyfikacji pierwotnego brzmienia monoaminowej teorii depresji. W nowej formule teoria ta wskazuje na zmiany adaptacyjne dotyczące receptorów serotoninowych i noradrenergicznych, które są konsekwencją wzmożonej aktywności neurotransmisji monoaminowej (następstwo działania leków), jako na kluczowe wydarzenia komórkowe konieczne do wystąpienia efektu przeciwdepresyjnego. Ta teza zdaje się w jakiś sposób uwzględniać fakt opóźnionego początku działania i działań niepożądanych, szczególnie nasilonych w pierwszych tygodniach terapii, jednak, jak się okaże później, ulegnie ona kolejnym przekształceniom (Stahl. 2008; Stahl. 2009).

Obecnie uważa się, że przeciwdepresyjny efekt używanych leków jest konsekwencją wzmożonych procesów neuroplastyczności, które są między innymi następstwem wzmożonej biosyntezy i uwalniania mózgowo-pochodnego czynnika wzrostu ((BDNF (z jęz. ang. *Brain derived neurotrophic factor*)). Innymi słowy, rozumienie biologicznych podstaw działania leków przeciwdepresyjnych ewoluuje od wzrostu stężenia neuroprzekaźników w synapsie, poprzez zmiany adaptacyjne poszczególnych receptorów, modulację wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału, aż po wpływ na translację białka, wzrost stężenia BDNF i wzmożoną neuroplastyczność. Powyższy fakt, opóźniony początek działania i nieskuteczność w wielu klinicznych przypadkach depresji stanowią przesłankę do poszukiwań nowych rozwiązań terapeutycznych, co wymusza równocześnie formułowanie nowych teoretycznych postulatów rozszerzających wiedzę o patogenezie zaburzeń depresyjnych. W ten sposób powstają nie tyle konkurencyjne teoretyczne ujęcia biologicznych podstaw depresji, co koncepcje zwracające uwagę na istotną rolę innych neuroprzekaźników zarówno w procesach patologicznych, jak i leczniczych. Przykładem takich rozwiązań mogą być np. teorie GABA-ergiczna czy też glutaminianergiczna. Oczywiście przytoczone teoretyczne stanowiska nie wyczerpują proponowanych możliwości teoretycznych (Sanacora i wsp. 2000; Sanacora i wsp. 2008; Duman i Voleti. 2012; Duman i wsp. 2012).



Rycina 1. Ogólny schemat działania leków przeciwdepresyjnych. Skróty: TLPD (trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne), SNRI (inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny i serotoniny), SSRI (selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny), NDRI (inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny i dopaminy), NRI (inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny). Rycina autorstwa Bartłomieja Pochwata wykorzystana w książce pt. *Wokół depresji* pod redakcją Gabriela Nowaka i Dariusza Adamka, Kraków 2012

1.2 Receptory glutaminianowe

Kwas glutaminowy jest podstawowym pobudzającym neuroprzekaźnikiem w mózgu. Swoje efekty komórkowe wywołuje poprzez pobudzanie dwóch klas receptorów. Kryterium podziału oparte na mechanizmie efektorowym związanym z pobudzeniem receptora pozwala wyróżnić receptory jonotropowe oraz metabotropowe. Wrażliwość na pobudzenie przez odmienne ligandy pozwala na wyznaczenie dalszego zróżnicowania w obrębie grupy receptorów jonotropowych. W ten sposób wyróżnia się receptory NMDA (wrażliwe na kwas N-metylo-D-asparaginowy), AMPA (wrażliwe na kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowy) oraz kainowe (pobudzane przez kwas kainowy) (Nakanishi. 1992; Traynelis i wsp. 2010).

Podział ze względu na powinowactwo do konkretnych ligandów nie wyczerpuje istotnych dystynkcji fizjologicznych pomiędzy podgrupami receptorów jonotropowych. Z racji tego, że ogromna liczba badań wskazuje na kluczową rolę receptorów AMPA i NMDA w bądź rozwoju, bądź w leczeniu depresji, w dalszej części pracy pominięta zostanie bliższa charakterystyka receptorów kainowych.

1.3 Receptory NMDA – budowa i charakterystyka biologiczna

Podobnie jak receptory AMPA i receptory kainowe receptory NMDA zbudowane są z czterech podjednostek, które połączone ze sobą tworzą właściwy kompleks receptora. Wskazuje się na siedem różnych podjednostek, które zaliczane są do trzech odmiennych podrodzin. Klasyfikacja do danej podrodziny jest następstwem homologii sekwencji reszt aminokwasowych, z których zbudowane są podjednostki. Na tej podstawie zidentyfikowano podjednostki GluN1 (cztery warianty splicingowe), GluN2 (do których zalicza się podjednostki GluN2A, GluN2B, GluN2C i GluN2D) oraz podjednostki GluN3 (GluN3A i GluN3B) (Traynelis i wsp. 2010, Cull-Candy i wsp. 2001; Köhr. 2006; Traynelis i wsp. 2010).

W strukturze wszystkich podjednostek NMDA można wyodrębnić cztery charakterystyczne elementy, które choć zdają się pełnić podobne funkcje, różnią się od siebie składem aminokwasów. Najbardziej zewnętrznie w stosunku do błony komórkowej znajduje się N-koniec, połączony za pomocą łącznika, tzw. linkera, z miejscem wiążącym agonistę. Ta część podjednostki jest związana z domeną transmembranową, do której przylega położony wewnątrzkomórkowo C-koniec odpowiedzialny za aktywację licznych kaskad przekazywania sygnału. Warto podkreślić, że z domeną wiążącą agonistę w podjednostce GluN1 wiąże się glicyna, natomiast kwas glutaminowy jest agonistą dla podjednostki GluN2. Aktywny receptor NMDA składa się obligatoryjnie z dwóch podjednostek GluN1 oraz dwóch podjednostek GluN2, ewentualnie zamiast podjednostek GluN2 receptor mogą formować podjednostki GluN3. Co istotne, do pobudzenia receptora wymagane jest związanie zarówno dwóch cząsteczek koagonisty, jak i dwóch cząsteczek agonisty, czyli odpowiednio glicyny i kwasu glutaminowego. Jak nietrudno zauważyć, z powodu istnienia kilku typów podjednostek w obrębie każdej z podrodzin receptor NMDA nie jest strukturą białkową o jednorodnej budowie, co przekłada się na funkcjonalną różnorodność poszczególnych typów receptorów NMDA. Jak pokazują liczne badania, receptory NMDA mogą być zarówno di-heteromeryczne, jak i tri-heteromeryczne. Podział ów zasadza się na możliwości występowania w strukturze jednego receptora dwóch podjednostek GluN2 z tej samej z podrodzin, bądź też z dwóch różnych podrodzin. Na przykład receptor NMDA o składzie GluN1/GluN2B będzie receptorem di-heteromerycznym, natomiast receptor NMDA zbudowany z dwóch podjednostek GluN1 i jednocześnie podjednostek GluN2A i GluN2B będzie zaklasyfikowany jako receptor tri-heteromeryczny. Tym samym liczba kombinacji, w jakie mogą układać się podjednostki, jest bardzo duża, co dodatkowo komplikuje możliwość pełnego zrozumienia, jakie dokładnie funkcje w transmisji glutaminianergicznnej pełnią poszczególne typy receptorów NMDA (Cull-Candy i wsp. 2001; Köhr. 2006; Traynelis i wsp. 2010)

Zróźnicowanie w obrębie podjednostek powoduje, że poszczególne receptory NMDA charakteryzują się różnymi właściwościami elektrofizjologicznymi. Najbardziej klasycznym przykładem jest wrażliwość receptora na tzw. blokadę magnezową. Przy spoczynkowych wartościach potencjału błonowego we wnętrzu kanału jonowego receptora NMDA ulokowany jest jon magnezu, będący zawadą przestrzenną uniemożliwiającą przepływ jonów wapnia czy sodu do wnętrza komórki. Zmiana potencjału błonowego wywołana pobudzeniem znajdujących się w pobliżu receptora NMDA receptorów, np. AMPA, jest przyczyną usunięcia magnezu z wnętrza kanału. Jakkolwiek etap ten jest niezbędny do aktywacji, receptora nie jest on wystarczający. Równocześnie miejsca wiążące agonistę każdej z podjednostek muszą związać glicynę i kwas glutaminowy. Dopiero koincydencja tych trzech wydarzeń aktywuje receptor (Paoletti i wsp. 1995; Traynelis i wsp. 2010; Paoletti i wsp. 2013).

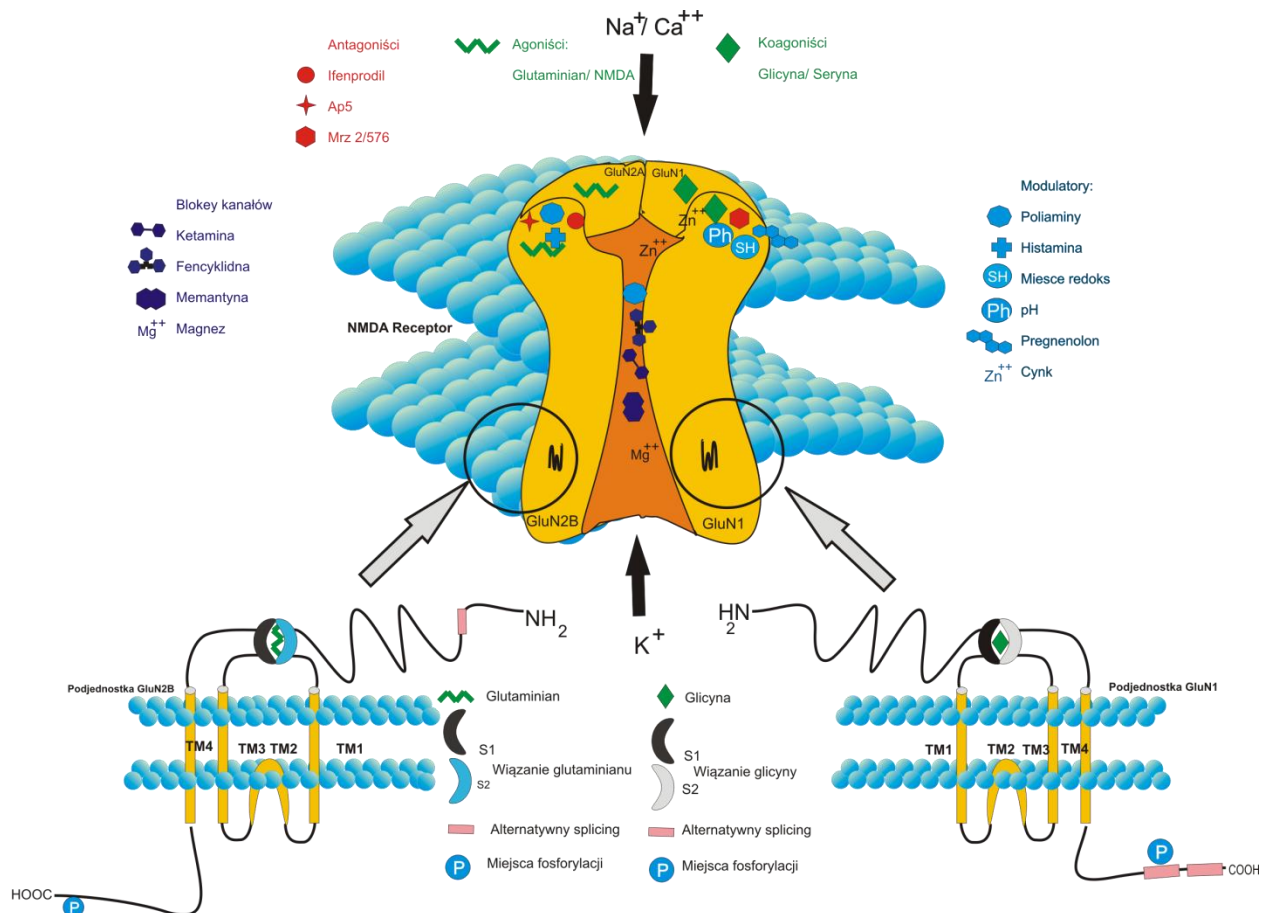
Zgodnie z danymi zawartymi w literaturze przedmiotu największą wrażliwość na blokadę magnezową prezentują receptory składające się z podjednostek GluN2A bądź GluN2B. Jeśli receptor zawiera w swoim składzie podjednostkę GluN2C lub GluN2D, opisany efekt jest kilkunastokrotnie słabszy i wydaje się, że przy fizjologicznym stężeniu magnezu blokada taka nie odgrywa żadnej roli w pobudliwości receptorów o takiej strukturze. Blok magnezowy nie ma zupełnie wpływu na funkcjonowanie receptorów zawierających podjednostkę GluN3 (Kotermanski i Johnson. 2009).

Warto także dodać, że oprócz tworzenia blokady zależnej od potencjału magnez osłabia aktywność receptora NMDA poprzez zablokowanie kinazy białkowej C (PKC), która poprzez fosforylację wzmacnia aktywność receptorów NMDA (Begon i wsp. 2001).

Skład podjednostek determinuje profil pobudliwości danego kompleksu receptorowego. Najniższe powinowactwo do kwasu glutaminowego i glicyny posiadają receptory di-heteromeryczne GluN1/GluN2A, co przekłada się na najszybsze zanikanie pobudzającego czynnościowego potencjału wywołanego przez receptory NMDA. Jednocześnie prawdopodobieństwo otwarcia kanału receptora NMDA o takiej strukturze jest największe. W przeciwieństwie do receptorów zbudowanych z podjednostek GluN1/GluN2A receptory, w skład których wchodzi podjednostki GluN1/GluN2D, charakteryzują się najdłuższym czasem zanikania tego potencjału. Receptory GluN1/GluN2B sytuują się pośrodku skali wyznaczonej przez ten parametr. Oprócz opisanej wcześniej wrażliwości na blok magnezowy będący pochodną układu podjednostek budujących receptor, pojedyncze z nich określają profil farmakologiczny – rozumiany w tym wypadku jako wrażliwość na modulacje za pomocą różnych ligandów. Na przykład protony hamują receptor NMDA poprzez przyłączenie się do podjednostek GluN2B lub GluN2D. Bardzo ciekawym przykładem modulacji

kompleksu NMDA jest blokada cynkowa. Jony te w niskim stężeniu wiążą się selektywnie z podjednostką GluN2A. Natomiast gdy stężenie cynku jest odpowiednio wyższe, kation ten hamuje receptor poprzez przyłączenie się do podjednostki GluN2B (Szewczyk i wsp. 2012; Paoletti i wsp. 2013).

Skład podjednostek, wyznaczając profil farmakologiczny i elektrofizjologiczny receptorów NMDA, determinuje także rolę odpowiednich receptorów w poszczególnych procesach fizjologicznych. Od wielu lat dobrze ugruntowana w wynikach licznych badań jest teza mówiąca o udziale receptorów NMDA w procesach neuronalnych związanych z pamięcią i uczeniem się. Procesy te, rozpatrywane na poziomie morfologii i anatomii komórek nerwowych, są ściśle powiązane z synaptogenezą. Bezsporny jest fakt istnienia długotrwałego wzmocnienia i wygaszenia synaptycznego zależnego od NMDA (LTP_{NMDA} oraz LTD_{NMDA}). Niemniej pobudzenie receptorów NMDA jest również niezbędne dla długotrwałego wzmocnienia synaptycznego zależnego od receptorów AMPA (LTP_{AMPA}). Aktywacja receptorów di-heteromerycznych GluN1/GluN2A jest warunkiem koniecznym dla masywnego napływu jonów wapnia do wnętrza neuronu. Z kolei wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia tych jonów powoduje aktywację mechanizmów efektorowych, takich jak np. kinaza CaMKII (związana z C-końcem podjednostki GluN2B), umożliwiających fosforylację i mobilizację receptorów AMPA. Jakkolwiek liczne dane nie pozostawiają wątpliwości co do udziału receptorów GluN1/GluN2A w generowaniu LTP, to rola receptorów zawierających podjednostkę GluN2B była dosyć niejasna. Z jednej strony, blokada receptorów przez antagonistów podjednostki GluN2B nie zaburzała występowania LTP, z drugiej strony, usunięcie tej podjednostki za pomocą metod inżynierii genetycznej prowadziło do zahamowania LTP oraz LTD. Wydaje się, że spójnym rozwiązaniem, które w jakimś stopniu tłumaczy obydwie obserwacje, jest zwrócenie uwagi na receptory tri-heteromeryczne GluN1/GluN2A/GluN2B. O ile receptory GluN1/GluN2A są kluczowe dla wzrostu stężenia jonów wapniowych, o tyle pobudzenie kompleksów tri-heteromerycznych jest koniecznym warunkiem mobilizacji białek gęstości posynaptycznej (PSD), takich jak GKAP, PSD-95, oraz aktywacji CaMKII. W świetle tych danych staje się zrozumiałe, dlaczego podanie Ro-6981, który jest selektywnym antagonistą podjednostki GluN2B, nie hamuje LTP. Otóż receptory tri-heteromeryczne GluN1/GluN2A/GluN2B są słabiej hamowane niż receptory o składzie GluN1/GluN2B. Tym samym pomimo blokady tej podjednostki zdolność do wywołania LTP pozostaje zachowana, co jest zupełnie niemożliwe u zwierząt z *knock-out* genu dla GluN2B (Paoletti i wsp. 2013).



Rycina 2. Schemat receptora NMDA z uwzględnieniem molekularnej struktury podjednostek i ligandów receptora. Schemat zaczerpnięto z pracy Szewczyk i wsp. w *Investigational NMDA receptor modulators for depression* z *Expert Opinion Investigational Drugs* 2012

1.4 Receptory AMPA – budowa i charakterystyka biologiczna

Na molekularną strukturę receptora AMPA składają się dokładnie te same elementy, które wyszczególniono przy charakterystyce receptora NMDA. Receptor AMPA zbudowany jest z czterech podjednostek, a w strukturze każdej z nich wyróżnia się zewnątrzkomórkowy N-koniec, miejsce wiążące agonistę, domenę transmembranową oraz wewnątrzkomórkowy C-koniec. Podjednostki wchodzące w skład receptorów AMPA należą do czterech podrodzin GluA1 do GluA4. Receptory AMPA mogą przyjmować postać zarówno heteromeryczną, jak i homomeryczną. Receptory homomeryczne najczęściej złożone są z czterech podjednostek GluA1. Natomiast receptory heteromeryczne to przede wszystkim heterodimery podjednostek GluA1/GluA2 oraz GluA2/GluA3. Cechą, która zasadniczo pozwala odróżnić receptory AMPA od receptorów NMDA, jest brak swoistego koagonisty, którego przyłączenie byłoby konieczne do pobudzenia receptora. Zatem jedynym agonistą, który łączy się z domenami wiążącymi agonistę, jest kwas glutaminowy. Jako że kwas glutaminowy charakteryzuje się niższym powinowactwem do receptorów AMPA niż do NMDA, proces dysocjacji w przypadku pobudzenia tych pierwszych następuje znacznie szybciej (Derkach i wsp. 2007; Traynelis i wsp. 2010).

Po związaniu się dwóch cząsteczek kwasu glutaminowego do miejsc wiążących agonistę podjednostek dochodzi do otwarcia kanału i napływu jonów sodu do wnętrza komórki. W zależności od składu podjednostek także inne jony mogą być przepuszczane przez kanał receptora; np. homomeryczne receptory AMPA złożone z podjednostek GluA1 odpowiadają za wprowadzenie jonów wapnia do wnętrza komórki, co ma zasadnicze znaczenie dla procesów związanych z pamięcią i uczeniem się. W każdym razie jest dość dobrze ugruntowanym postulatem, że receptory AMPA związane są z przewodzeniem szybkiego potencjału pobudzającego pomiędzy synapsami glutaminianergicznymi, co wymaga napływu elektrododatnich jonów do wnętrza neuronu. Ponadto, jak wspomniano wcześniej, pobudzenie receptora AMPA jest kluczowym synaptycznym procesem, który poprzez zmianę potencjału błony komórkowej i następnie usunięcie blokady magnezowej inicjuje transmisję sygnału poprzez receptory NMDA (Derkach i wsp. 2007).

W poprzednim akapicie wspomniano o procesach długotrwałego wzmocnienia synaptycznego oraz długotrwałego wygaszania synaptycznego, jednocześnie podkreślając w obydwu wzorcach neuronalnej aktywności niebagatelną rolę receptorów NMDA. Jakkolwiek liczne badania wskazują na możliwość LTP zależnego od receptorów NMDA, to należy pamiętać, że ogromna większość badań dotyczących LTP

i LTD przeprowadzonych na komórkach obszarów CA1 i CA3 hipokampa uwypukla fundamentalne znaczenie receptorów AMPA w jednym i drugim wydarzeniu.

Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne można podzielić na trzy etapy. Pierwsze 30 minut będące następstwem pobudzenia synapsy przez bodźce o wysokiej częstotliwości to tzw. e-LTP (wczesny LTP, z ang. *early LTP*). W kolejnej fazie mówi się o stabilizacji LTP, a ostatni etap to tzw. l-LTP (późny LTP, z ang. *late LTP*). O ile w trzeciej fazie LTP podjednostki receptorów AMPA są syntetyzowane, o tyle dla dwóch pierwszych faz aktywacja i pobudzenie receptorów AMPA są warunkiem koniecznym. Jeśli czynnikiem wyzwalającym LTP, czyli zarazem początkiem e-LTP jest masowy napływ jonów wapnia do wnętrza komórki za pomocą pobudzonych receptorów NMDA, to można powiedzieć, że w kolejnym kroku wapniowy sygnał jest przekształcany między innymi w aktywację receptorów AMPA. W obu obszarach CA1 i CA3 hipokampa wzrost stężenia jonów wapnia aktywuje liczne kinazy, w tym także kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny II (CaMKII), kinazę białkową A (PKA) oraz kinazę białkową C (PKC). Białka te w aktywnej formie fosforylują reszty seryny podjednostki GluA1 receptora AMPA. Najnowsze doniesienia wskazują, że istnieją co najmniej trzy reszty seryny, które ulegają fosforylacji, seryna 818, 831 i 845 (odp. P-S818, P-S831, p-S845) (Esteban i wsp. 2003; Derkach i wsp. 2007; Lee i wsp. 2010).

Bazując na badaniach przeprowadzonych na neuronach hipokampa, można stwierdzić, że fosforylacja seryny 845 przez PKA jest potrzebna do zwiększenia okołosynaptycznej puli receptorów AMPA homomerycznych. Innymi słowy, następstwem tej fosforylacji jest zwiększona dostępność receptorów, które w wyniku kolejnych zdarzeń mogą wejść bezpośrednio do synapsy. Natomiast ufosforylowanie seryny 831 przez PKC bądź CaMKII zwiększa przepuszczalność homomerycznych receptorów GluA1 dla jonów wapnia oraz prawdopodobieństwo otwierania kanału. Prace prowadzone z myszami genetycznie modyfikowanymi pokazują, że brak jednej bądź drugiej fosforylacji nie zaburza LTP w obszarze CA1 hipokampa. W sytuacji gdy obie reszty serynowe: 831 oraz 845 nie mogą ulec fosforylacji, występowanie LTP jest upośledzone. Tym samym możliwość fosforylacji jednej bądź drugiej reszty jest warunkiem koniecznym dla długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w obszarze CA1 hipokampa. Dodatkowo ta sama grupa badawcza pokazuje konieczną relację pomiędzy fosforylacją seryny 845 i długotrwałym wygaszaniem synaptycznym (Lee i wsp. 2010).

Co prawda większość eksperymentów, których celem jest określenie dokładnej roli fizjologicznej poszczególnych fosforylacji receptora AMPA, skupia się na grupach neuronów hipokampa, jednak istnieją

także dane, które wskazują na zbliżoną fizjologiczną rolę poszczególnych fosforylacji także w innych obszarach mózgu (Lee i Kirkwood. 2011).

W dalszym etapie LTP, czyli po upływie około 30 minut, podjednostki homomerycznych receptorów AMPA GluA1 ulegają zamianie na podjednostki GluA2. Receptory AMPA złożone z podjednostek GluA1/GluA2 stają się nieprzepuszczalne dla jonów wapnia. Nie wyjaśniono jak dotąd znaczenia fosforylacji podjednostek GluA1 budujących heteromeryczne receptory GluA1/GluA2 (Lee i Kirkwood. 2011). Warto dodać, że tak wiele miejsca poświęcono w tym wprowadzeniu procesom neuroplastyczności i modulacji receptorów AMPA i NMDA, ponieważ mają one niebagatelne znaczenie dla farmakoterapii depresji.

1.5 Przeciwdepresyjny mechanizm działania antagonistów NMDA

Współczesna terapia przeciwdepresyjna obejmuje szeroką gamę leków, niestety o dość jednorodnym mechanizmie działania, związanym głównie z aktywacją układu monoamin. Stosunkowo niski odsetek remisji wśród pacjentów depresyjnych, liczne działania niepożądane i opóźniony początek działania wymuszają poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych (Stahl. 2008).

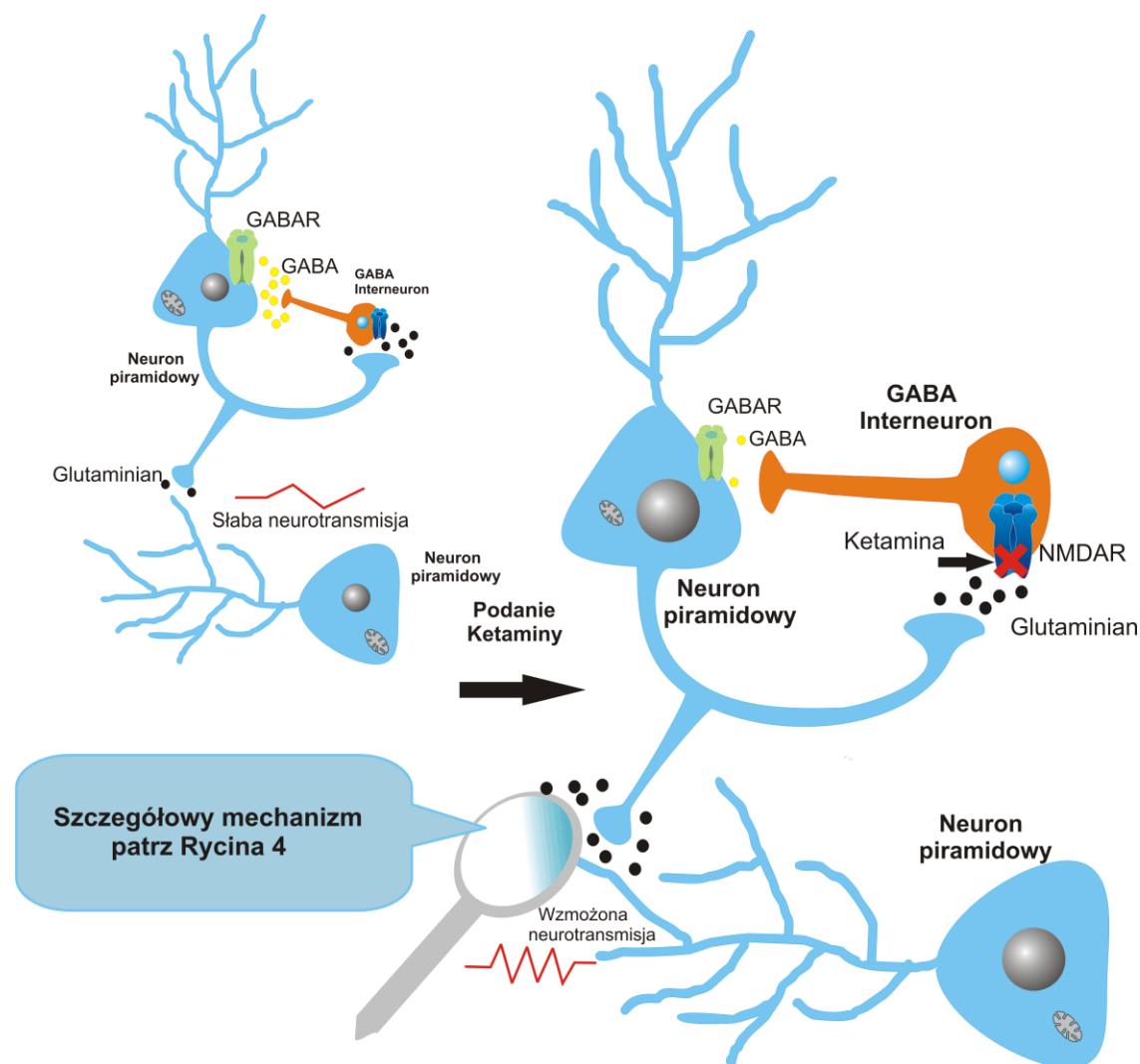
Ostatnie dwie dekady badań nad neurobiologicznymi fundamentami depresji zdominowały prace poświęcone układowi glutaminanergicznemu. Odkrycia dotyczące ekscytotoksyczności, czyli zjawiska, u podłoża którego leży hiperstymulacja receptorów NMDA, i powiązanie jej z przewlekłym stresem odgrywa ogromną rolę w rozumieniu procesów, które mogą być istotne dla patofizjologii depresji (Palucha i Pilc. 2005; Skolnick i wsp. 2009; Kiss i wsp. 2012). Dodatkowo, znacząca ilość badań ukazuje zarówno podwyższony, jak i obniżony poziom glutamianu w surowicy chorych na depresję, a także wahania w stężeniu czy to glutamianu, czy glutaminy w poszczególnych rejonach kory przedczołowej oraz zakrętu obręczy, co zdaje się świadczyć na korzyść hipotezy mówiącej o zaawansowanym rozregulowaniu transmisji glutaminanergicznej w depresji (Krystal i wsp. 2013).

O ile jeszcze ponad dekadę temu wspominając o kwasie glutaminowym w kontekście depresji, podkreślano przede wszystkim możliwy udział tego neuroprzekaźnika w rozwoju choroby, o tyle ostatni okres badań zdaje się radykalnie zmieniać perspektywę, wskazując na dużo bardziej skomplikowane zależności pomiędzy funkcjonowaniem układu glutaminanergicznego a depresją i jej leczeniem. Do takiego stanu rzeczy przyczyniły się głównie kliniczne sukcesy w leczeniu depresji ketaminą (Zarate i wsp. 2006).

Z punktu widzenia budowy chemicznej ketamina to pochodna fencyklidyny (PCP) pozbawiona heterocyklicznego pierścienia piperydyny. Jak się okazuje, ta modyfikacja strukturalna znacząco redukuje działania uboczne znacznie bardziej nasilone w przypadku fencyklidyny, czyniąc z ketaminy lek bardziej akceptowalny klinicznie (MCCARTHY i wsp. 1965; Hevers i wsp. 2008). Farmakodynamiczny profil ketaminy w najbardziej podstawowym ujęciu jest podobny do fencyklidyny. Obydwie cząsteczki wykazują powinowactwo do tzw. miejsca wiązania dla fencyklidyny, które leży wewnątrz kanału receptora NMDA. Blokada kanału (antagonizm niekompetycyjny) uniemożliwia przepływ jonów i hamuje aktywację mechanizmów efektorowych związanych z pobudzeniem receptora (Mealing i wsp. 1999; Mealing i wsp. 2001; Traynelis i wsp. 2010).

Prosta blokada receptorów NMDA to pierwotna robocza hipoteza tłumacząca przeciwdepresyjne właściwości ketaminy. Obecnie wiadomo, że blokada receptora NMDA jest etapem inicjującym kaskadę wydarzeń neuronalnych, których punktem dojścia jest aktywacja procesów biosyntezy nowych białek o zróżnicowanych funkcjach, co w skali komórkowej odpowiada reorganizacji i tworzeniu nowych połączeń synaptycznych (Li i wsp. 2010; Duman i Voleti. 2012; Duman i wsp. 2012). Jednakowoż blokada receptora NMDA może sugerować, że przeciwdepresyjny efekt wywołany przez ketaminę jest konsekwencją zahamowania transmisji glutaminianergicznej. Szczegółowe badania poświęcone zrozumieniu przeciwdepresyjnego mechanizmu ketaminy wskazują na dwie kluczowe zmienne, których funkcją jest przeciwdepresyjna skuteczność ketaminy. Oczywiście pierwszą zmienną jest blokada receptora NMDA, natomiast druga zmienna to miejsce w mózgu, czy też grupa neuronów, których receptory NMDA są blokowane, a których zablokowanie jest warunkiem niezbędnym dla wystąpienia przeciwdepresyjnego efektu ketaminy (Sanacora i wsp. 2013).

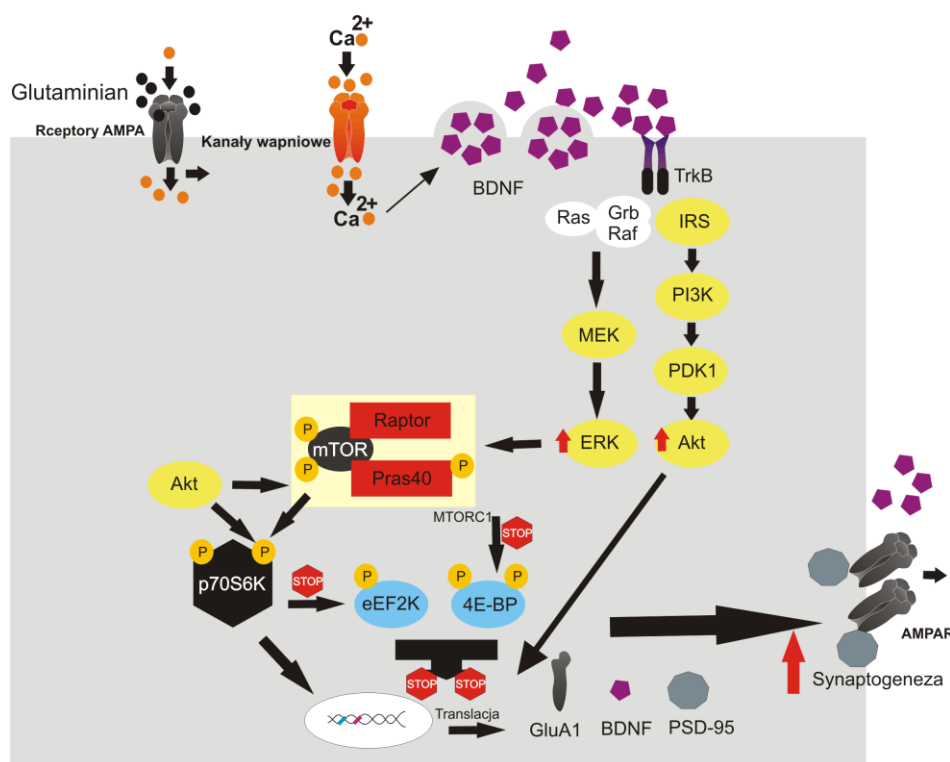
Na podstawie badań przedklinicznych oraz danych uzyskanych z neuroobrazowania ludzkiego mózgu określono, że blokada receptorów NMDA znajdujących się na interneuronach warstwy piątej kory przedczołowej jest najprawdopodobniej najważniejszym mechanizmem molekularnym odpowiadającym za skuteczność ketaminy. W fizjologicznych warunkach wymienione interneurony tonicznie uwalniają GABA, który wiąże się z receptorami GABA znajdującymi się na neuronach glutaminianergicznych warstwy piątej kory przedczołowej, hamując ich aktywność. Po podaniu ketaminy dochodzi do wygaszenia tonicznej aktywności interneuronów i do równoczesnego wzmożenia aktywności neuronów korowych, co ostatecznie oznacza zwiększone uwalnianie kwasu glutaminowego do przestrzeni synaptycznej. W tym wypadku ostatecznym wydarzeniem rozpatrywanym w skali neuronalnej jest nasilenie transmisji glutaminianergicznej w korze przedczołowej (Moghaddam i wsp. 1997; Sanacora i wsp. 2013).



Rycina 3. Mechanizm prowadzący do odhamowania neuronów piramidowych kory przedczołowej po podaniu ketaminy

W wyniku nagłego (następstwo blokady interneuronów) zwiększonego stężenia glutaminianu w synapsie pobudzane są postsynaptyczne receptory AMPA. Konsekwencją wzmożonej aktywności receptorów AMPA jest zwiększona częstotliwość otwierania kanałów wapniowych zależnych od potencjału. Podwyższony wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia wzmacnia uwalnianie do przestrzeni synaptycznej cząsteczek BDNF, które łączą się ze swoistym receptorem TrkB będącym kinazą treoninową. Dodatkowo receptory AMPA aktywowane są przez procesy fosforylacji podjednostki GluA1 co skutkuje wbudowywaniem tych receptorów w synapsę. Przyłączenie się dwóch cząsteczek BDNF do receptora powoduje jego dimeryzację i autofosforylację, która aktywuje mechanizmy efektorowe związane z fosforylacją kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K) i kinazy Akt (Akt) oraz fosforylacją tzw. MAP-kinaz.

Wynikiem aktywacji obydwu wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału jest fosforylacja kompleksu kinazy mTOR (mTORc). Ufosforylowany kompleks fosforyluje kinazę S6 (S6K), której aktywność katalityczna zostaje tym samym zahamowana. To z kolei stanowi przyczynę obniżenia poziomu fosforylacji eukariotycznego czynnika elongacyjnego (eEF2K), co jest równoznaczne z jego aktywacją. Dodatkowo kompleks mTORc poprzez fosforylację hamuje aktywność kinazy białka wiążącego 4E (4E-BP). Zarówno fosforylacja S6K, jak i obniżenie poziomu fosforylacji eEF2K i 4E-BP prowadzą do wzmożenia procesów translacji i biosyntezy białek gęstości synaptycznej, jak np. PSD-95 czy GKAP oraz BDNF (Jourdi i wsp. 2009). Jest to pierwsza w miarę mocno udokumentowana empirycznie hipoteza umożliwiająca kompleksowe wyjaśnienie, w jaki sposób nieselektywny niekompetycyjny antagonistą receptora NMDA działa przeciwdepresyjnie. Co więcej, hipoteza ta wydaje się zgodna z ogólniejszą hipotezą wskazującą na wzmożenie procesów neuroplastyczności jako konsekwencję terapii klasycznymi lekami przeciwdepresyjnymi (Skolnick i wsp. 1996; Skolnick. 1999; Duman i Voleti. 2012). Konkurencyjną teorią do opisanej wyżej jest koncepcja przedstawiona przez Autry i wsp., którzy wykazali, że blokada receptora NMDA przez ketaminę hamuje fosforylację eEF2K, co zwiększa syntezę BDNF (Autry i wsp. 2011).



Rycina 4. Aktywacja szlaku mTOR prowadząca do syntezy BDNF i synaptogenezy

1.6 Antagoniści receptora NMDA w badaniach klinicznych i przedklinicznych

Skuteczność ketaminy w badaniach przedklinicznych była wykazana na wiele różnych sposobów. Najbardziej spektakularne są badania przeprowadzone przez Li i wsp., w których pokazano, że pojedyncza dawka ketaminy odwraca w teście preferencji sacharozy zaburzenia wywołane przez chroniczny nieprzewidywany stres (Li i wsp. 2011). W badaniach klinicznych jednorazowa dawka ketaminy znacząco poprawiała stan chorego już kilka godzin po podaniu. Efekt ten utrzymywał się od jednego do dwóch dni, a w niektórych przypadkach nawet do dwóch tygodni (Berman i wsp. 2000; Zarate Jr. i wsp. 2006; Aan Het Rot i wsp. 2012). Co najważniejsze, skuteczność pojedynczej dawki ketaminy wykazano w przypadkach depresji odpornej na klasyczne leki przeciwdepresyjne, w depresji odpornej na elektrowstrząsy, w depresji z rodzinnym alkoholizmem, w depresji lekoopornej ze współwystępującymi planami samobójczymi, a także w lekoopornej depresji bipolarnej. We wszystkich tych przypadkach inna terapia okazała się nieskuteczna (Zarate Jr. i wsp. 2006; Phelps i wsp. 2009; Diazgranados i wsp. 2010; Ibrahim i wsp. 2011; Ibrahim i wsp. 2012). Niestety pomimo niewątpliwych sukcesów terapeutycznych odniesionych dzięki podawaniu ketaminy, zastosowanie tego leku u chorych na depresję czy inne schorzenia afektywne jest dość mocno ograniczone ze względu na ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Szczególny problem stanowią przede wszystkim efekty psychotyczne i potencjał uzależniający ketaminy (Krystal i wsp. 2013; Pilc i wsp. 2013). Dlatego też grupa antagonistów receptora NMDA jest obecnie w centrum uwagi badaczy poszukujących nowych rozwiązań terapeutycznych w chorobach afektywnych.

Wydaje się, że wszelkie starania, których celem jest znalezienie nowego leku przeciwdepresyjnego, skupiają się na zachowaniu spektrum działania ketaminy z jednoczesnym osłabieniem potencjału do wywoływania działań niepożądanych. Z farmakodynamicznego punktu widzenia modyfikacje badanych cząsteczek zmierzają w kierunku ograniczenia antagonizmu ketaminy. W badaniach przedklinicznych testowane są między innymi substancje będące modulatorami miejsca glicynowego, jak GLYX-13 czy 7-CTKA, selektywni antagoniści podjednostki GluN2B receptora NMDA, jak Ro-25-698 (Li i wsp. 2010; Burgdorf i wsp. 2011; Burgdorf i wsp. 2013; Lima-Ojeda i wsp. 2013; Workman i wsp. 2013; Zhu i wsp. 2013). W drugiej fazie testów klinicznych znajdują się selektywni antagoniści podjednostki GluN2B, tacy jak MK-0657, CP-101,606 czy tzw. *low-trapping* antagoniści kanału receptora NMDA, jak AZD-6755 (lanicemina) (Preskorn i wsp. 2008; Ibrahim i wsp. 2012; Sanacora i wsp. 2013; Zarate Jr. i wsp. 2013).

Pokażna liczba badań przedklinicznych, a także pewna liczba prób klinicznych, wskazuje na jeszcze jeden możliwy kierunek rozwoju farmakoterapii depresji, mianowicie na wykorzystanie endogennych antagonistów receptora NMDA. Kompleks receptora NMDA może być modulowany przez wiele endogennych związków czy molekuł. Pośród nich można wymienić dwa kationy, mianowicie cynk i magnez.

1.7 Magnez w chorobach afektywnych

Znaczenie jonów magnezu dla biochemicznych procesów organizmu jest nie do przecenienia. Pierwiastek ten jest niezbędnym elementem dla aktywności katalitycznej około 300 białek enzymatycznych (Ryan. 1991). Stężenie jonów magnezu utrzymane w normie fizjologicznej jest konieczne dla prawidłowego funkcjonowania mięśni, układu sercowo-naczyniowego, układu kostnego, równowagi kwasowo-zasadowej oraz biosyntezy białek i kwasów nukleinowych (Grubbs i Maguire. 1987). Magnez jednakże jest również mikroelementem o niebagatelnym znaczeniu dla właściwego funkcjonowania centralnego systemu nerwowego, a fluktuacje jego stężeń mogą być czynnikiem ryzyka prowadzącym do zaburzeń psychicznych (Paoletti i wsp. 1995; Szewczyk i wsp. 2008; Szewczyk i wsp. 2012).

Wyniki badań dotyczących zawartości magnezu w surowicy pacjentów ze zdiagnozowaną depresją nie są jednorodne. Obniżone stężenie magnezu było obserwowane głównie u pacjentów z przewlekłą depresją jednobiegunową (Kirov i wsp. 1994). Podobna korelacja nie występowała natomiast w ostrych epizodach depresji (Linder i wsp. 1989; Hashizume i Mori. 1990; Hasey i wsp. 1993; Eby i Eby. 2006). Inne badania także ukazują fluktuacje stężenia magnezu u chorych z chorobami afektywnymi. Co ciekawe, wahania te są skorelowane z fazą choroby. Obniżony poziom magnezu obserwowano u chorych z rozwiniętą pełnoobjawową depresją, natomiast wraz z ustępowaniem choroby stężenie magnezu wracało do normy (Frizel i wsp. 1969; Hashizume i Mori. 1990).

Znaczenie deficytu magnezu dla pracy centralnego systemu nerwowego ukazują także wyniki badań przedklinicznych. Zwierzęta z hypomagnezemią objawiają zachowania depresyjne i lękowe. Molekularne podłoże tych zmian jest związane z nadaktywnością osi HPA (podwzgórze-przysadka-nadnercze). Notowano zarówno wzrost transkrypcji mRNA dla kortykoliberyny w jądrze przykomorowym podwzgórza, jak i podwyższony poziom adrenokortykotropiny (ACTH) w osoczu. Wszystkie te zaburzenia były normalizowane przez chroniczne podanie dezipraminy (Singewald i wsp. 2004; Sartori i wsp. 2012).

Dotychczas wskazywaliśmy na pewne efekty fizjologiczne i dysfunkcje behawioralne związane z deficytem magnezu. Jednakże nie wolno zapomnieć, że istnieje pewna liczba prób przedklinicznych, w których wykazano aktywność samego magnezu w kontekście potencjalnego efektu terapeutycznego w schorzeniach psychiatrycznych. Jony magnezu redukują czas bezruchu w teście wymuszonego pływania (ang. *forced swim test* – FST) (Decollogne i wsp. 1997; Poleszak i wsp. 2005a). Jony magnezu podawane

wspólnie z lekami przeciwdepresyjnymi w FST wzmacniały efekt przeciwdepresyjnego działania leku przeciwdepresyjnego (Poleszak i wsp. 2005b; Poleszak i wsp. 2007). Ponadto magnez w teście podniesionego labiryntu krzyżowego wykazywał działanie anksjolityczne (Poleszak i wsp. 2004; Poleszak i wsp. 2004). Głównym mechanizmem, który wydaje się odpowiedzialny za skuteczność magnezu w FST, jest blokada receptorów NMDA. W tych badaniach zwierzętom podawano magnez z kwasem NMDA, który znosił przeciwdepresyjny efekt magnezu. Tezę tę wzmacnia fakt, że wspólne podanie jonów magnezu z nieaktywną dawką antagonistów NMDA, np. CGP 37849, D-cykloseryna, L-701,324 czy MK-801, znacząco skraca czas immobilizacji zwierząt w FST (Poleszak i wsp. 2007; Poleszak i wsp. 2008b). W bardziej złożonych eksperymentach u młodych i starych szczurów magnez usprawnia procesy kognitywne, takie jak pamięć przestrzenna mierzona zachowaniem w teście wodnego labiryntu. Usprawnieniom procesów kognitywnych towarzyszyła reorganizacja połączeń synaptycznych w hipokampie oraz nasilona ekspresja BDNF w hipokampie (Slutsky i wsp. 2010). Jakkolwiek trzeba zaznaczyć, że aktywność magnezu w zwierzęcych modelach depresji jak dotąd nie była sprawdzana.

1.8 Metalotioneiny a choroby ośrodkowego układu nerwowego

Metalotioneiny (MT) należą do rodziny niskocząsteczkowych białek, które dzięki dużej zawartości grup sulfhydrylowych mają zdolność do łatwego przyłączania jonów metali. Zostały one odkryte w 1957 roku przez Margoshesa i Valleego, którzy wyizolowali z kory nerek końskich białko zawierające dużą ilość kadmu (Margoshes.1957). Białka te ze względu na swoje właściwości zostały później nazwane metalotioneinami.

MT zbudowane są z około 60 reszt aminokwasowych. W ich budowie wyróżnia się dwie domeny - α i β . Pierwsza zawiera 11, a druga 9 reszt cysteinyłowych, które warunkują wiązanie jedno- lub dwuwartościowych jonów metali. W stanie fizjologicznym MT związane są głównie z jonami cynku, który łatwo ulega oddysocjowaniu i może zostać zastąpiony metalem o wyższym powinowactwie do MT (Babula i wsp. 2012). MT występują również w formie niezwiązanej z metalami i wówczas noszą nazwę apotionein. Pomimo dobrze określonej struktury biochemicznej i długiego czasu trwania badań fizjologiczna rola tych białek nie jest do końca jasna. Podstawową i najlepiej opisaną funkcją tych białek jest ich udział w detoksyfikacji organizmu (zabezpieczają one organizm przed toksycznym działaniem metali ciężkich, takich jak Cd, Pb czy Hg), homeostazie metali, zwłaszcza cynku i miedzi (Babula i wsp. 2012), oraz procesach przeciwzapalnych (Babula i wsp. 2012). Obecnie zwraca się uwagę, że MT są zaangażowane w takie procesy fizjologiczne jak hamowanie procesów proapoptotycznych, zwiększanie przeżywalności komórek oraz regeneracji tkanek (Santos i wsp. 2008).

Dotychczas odkryto i opisano cztery izoformy MT: MT-1, MT-2, MT-3 i MT-4. W centralnym systemie nerwowym występują trzy z nich: MT-1, MT-2 i MT-3.

1. MT-1 i MT-2 (MT-1/2)

W mózgu występują głównie w astrocytach i w mniejszej ilości w neuronach korowych. Interesujący jest fakt, że poziom MT-1/2 wzrasta po uszkodzeniu mózgu (Van Lockeren Campagne i wsp. 1999). Uważa się, że ta zwiększona ekspresja MT-1/2 pojawia się w celu ochrony przed uszkodzeniem neuronalnym wywołanym urazem chemicznym, niedokrwieniem lub ekscytotoksycznością, jakkolwiek mechanizm odpowiedzialny za neuroprotekcijną rolę MT-1/2 nie został do tej pory wyjaśniony. Wydaje się, że w odpowiedzi na uszkodzenie mózgu dochodzi do uwalniania MT-1/2 z astrocytów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w obszarze uszkodzenia i że to ta zewnątrzkomórkowa forma MT-1/2 może bezpośrednio oddziaływać na neurony (Yu i wsp. 2011). Astrocytarna forma MT-1/2 jest również silnie

indukowana w odpowiedzi na stres oksydacyjny, który uważany jest obecnie za jedną z głównych przyczyn wzrostu poziomu metalotionein w całym mózgu (Ruttkay-Nedecky i wsp. 2013).

2. MT-3

MT-3 nazywana jest również czynnikiem hamującym wzrost neuronów, ze względu na jej hamujący wpływ na dojrzewanie i rozwój komórek nerwowych. MT-3 była początkowo uważana za formę specyficzną dla neuronów, jednak jej obecność stwierdza się również w komórkach kanalików nerkowych oraz niektórych nowotworów. W mózgu MT-3 występuje głównie w korze, hipokampie i jądrach migdałowych. Myszy transgeniczne z nadekspresją MT-3 wykazują zwiększony poziom cynku w regionach mózgu, w których obserwowano zwiększoną ekspresję MT-3 mRNA. MT-3, podobnie jak MT-1/2, ma właściwości antyoksydacyjne, przy czym działanie to jest dawkozależne. Nie ma natomiast właściwości przeciwzapalnych. W zdrowym mózgu poziom MT-3 jest wysoki, ale jest znacznie obniżony w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera.

Rozdział 2

Cel pracy

Wyniki opisanych we wstępie badań klinicznych i przedklinicznych wskazują na możliwość zastosowania jonów magnezu w terapii depresji. Głównym celem niniejszej pracy było określenie skuteczności chronicznego podania jonów magnezu w odwracaniu zmian behawioralnych obserwowanych w zwierzęcych modelach depresji oraz określenie wpływu chronicznego podania jonów magnezu na układ glutaminianergiczny w tych modelach. Powyższe zadania zrealizowano, wykorzystując następujące procedury:

1. Badania behawioralne

- a) Określenie skuteczności chronicznego podania trzech dawek jonów magnezu (10, 15 i 20 mgMg/kg masy ciała) w teście picia 1-procentowego roztworu sacharozy w modelu chronicznego łagodnego stresu u szczurów.
- b) Określenie skuteczności chronicznego podania trzech dawek jonów magnezu (10, 15 i 20 mgMg/kg masy ciała) w testach biernego unikania (badanie zdolności nabywania odruchu biernego unikania) i wolnego pola w modelu obustronnego usunięcia opuszek węchowych (bulbektomia lub OB) u szczurów.

2. Badania biochemiczne

- a) Oznaczenie za pomocą metody *western blotting* wpływu chronicznego łagodnego stresu i chronicznych podań jonów magnezu w dawce 15mg/Mg/kg na ekspresję wyszczególnionych poniżej białek:

- podjednostki GluN1 receptora NMDA
- podjednostek GluN2A i GluN2B receptora NMDA
- podjednostek GluA1 i GluA2 receptora AMPA
- ufosforylowanej podjednostki GluA1 P-S831 i P-S845
- białka gęstości synaptycznej PSD-95 (ang. *postsynaptic density protein*)
- BDNF i GAD-67

b) Oznaczenie za pomocą metody *western blotting* wpływu operacji usunięcia opuszek węchowych i chronicznych podań jonów magnezu w dawce 15mg/Mg/kg masy ciała na ekspresję wyszczególnionych niżej białek w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym:

- podjednostek receptorów NMDA (GluN2A, GluN2B)
- podjednostki GluA1 receptora AMPA
- ufosforylowanych podjednostek receptora AMPA (GluA1-fosfoseryna-831) i AMPA (GluA1-fosfoseryna-845)
- BDNF
- GAD-67

c) Określenie za pomocą metody RT-PCR wpływu operacji usunięcia opuszek węchowych i chronicznych podań jonów magnezu w dawce 15mg/Mg/kg masy ciała na poziom mRNA podjednostek GluN2A i GluN2B receptora NMDA oraz metalotioneiny 1, 2 i 3 w hipokampie, korze przedczołowej i ciele migdałowatym.

d) Oznaczenie stężenia jonów magnezu w surowicy w modelach bulbektomii i chronicznego łagodnego stresu.

Rozdział 3

Materiały i metody

3.1 Model chronicznego łagodnego stresu

1. Zwierzęta laboratoryjne

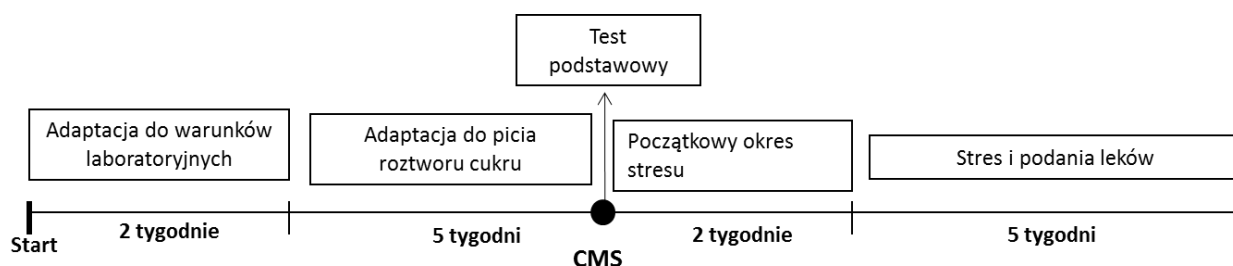
Eksperyment przeprowadzono na szczurzych samcach rasy Wistar (Charles River). Zwierzęta umieszczono w laboratorium siedem tygodni przed rozpoczęciem właściwego eksperymentu. Każde ze zwierząt zostało umieszczone i przechowywane w osobnej klatce z zachowaniem naturalnego cyklu dobowego, w zakresie temperatur od 20 do 22°C i z pełnym dostępem do wody i jedzenia. Wszystkie badania na zwierzętach były prowadzone za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej przy IFPAN w Krakowie.

2. Procedura chronicznego łagodnego stresu

Podczas pierwszych dwóch tygodni zwierzęta adaptowano do nowego miejsca, a przez następne pięć tygodni ich przebywania w laboratorium poddawano je dwa razy w tygodniu adaptacji do picia 1-procentowego roztworu sacharozy. Każda pojedyncza próba trwająca godzinę była poprzedzana 14-godziną deprywacją wody i jedzenia. Ilość wypijanego 1-procentowego roztworu sacharozy była mierzona za pomocą ważenia butelek przed i po każdym teście. Na podstawie wyników uzyskanych z ostatniego adaptacyjnego testu picia sacharozy zwierzęta podzielono na dwie grupy. Kryterium podziału była jednakowa ilość wypijanego roztworu sacharozy. Pierwsza z grup została poddana trwającej siedem tygodni procedurze chronicznego łagodnego stresu, natomiast druga służyła za grupę kontrolną. Na jeden tygodniowy cykl stresu składały się następujące procedury: deprywacja wody i jedzenia, przekręcenie podstawy klatki o 45°, zmoczenie ściółki, jednokrotne umieszczenie dwóch szczurów w jednej klatce, przerywane oświetlenie (zmiana następująca co dwie godziny), oświetlanie za pomocą lampy stroboskopowej i brak stresu. Bodźce stresowe były aplikowane dzień i noc przez cały czas trwania eksperymentu, a czas trwania poszczególnych bodźców wahał się od 10 do 14 godzin. Zwierzęta kontrolne przebywały w osobnym pomieszczeniu bez kontaktu z grupą stresowaną.

3. Podanie leków

Po początkowych dwóch tygodniach (z siedmiu tygodni) stresu zwierzęta zostały podzielone na 5 podgrup. Za kryterium podziału przyjęto podobną ilość wypijanego roztworu sacharozy. Równocześnie w ten sam sposób i na podstawie tego samego kryterium wyodrębniono 5 podgrup zwierząt kontrolnych. Liczebność każdej z 10 wyodrębnionych w ten sposób podgrup wynosiła 8 osobników. Następnie każdej podgrupie w obrębie każdej z grup podawano przez pięć tygodni odpowiednio: sól fizjologiczną, jedną z trzech zastosowanych dawek jonów magnezu (10, 15, 20 mgMg/kg masy ciała w postaci soli – wodoroasparaginianu magnezu - Farmapol) lub imipraminę (Sigma Aldrich), która służyła za lek referencyjny. Wszystkie substancje były podawane dootrzewnowo, codziennie około godziny 10⁰⁰. Cotygodniowy test picia 1-procentowego roztworu sacharozy przeprowadzano zawsze 24 godziny po ostatniej dawce magnezu, imipraminy bądź roztworu soli fizjologicznej.



Rycina 5. Schemat poszczególnych etapów modelu chronicznego łagodnego stresu

3.2 Model bulbektomii

1. Zwierzęta laboratoryjne

Eksperyment został przeprowadzony na samcach szczurów rasy Sprague-Dawley. Masa zwierząt poddanych operacji chirurgicznej wahała się od 220 do 250 gramów. Zwierzęta trzymano w naturalnym cyklu dobowym z dostępem do światła w godzinach od 7 do 19, w pomieszczeniu o temperaturze od 19 do 21°C. Zwierzęta umieszczone po cztery w klatce; przez cały czas trwania eksperymentu miały dostęp do wody oraz granulowanej karmy. Liczność każdej z eksperymentalnych grup zawierała się w przedziale od 6 do 8 szczurów. Po czternastu dniach podawania leków wszystkie zwierzęta zostały poddane testowi wolnego pola, a dwa dni później testowi biernego unikania. Testy te zostały wykonane w godzinach od 9⁰⁰ do 14⁰⁰. Wszystkie eksperymenty ze zwierzętami wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej przy IFPAN w Krakowie.

2. Bulbektomia – procedura chirurgiczna

Operację obustronnego usunięcia opuszek węchowych przeprowadzono po trwającym tydzień okresie adaptacji zgodnie z procedurą opisaną w pracy Nowak i wsp. 2003. Zwierzęta były znieczulane ketaminą w dawce 100mg/kg masy ciała i ksylazyną w dawce 10 mg/kg masy ciała. Następnie szczury umieszczano na stoliku stereotaktycznym. Po przecięciu skóry na głowie odsuwano mięśnie czaszkowe oraz okostną w celu odsłonięcia kości czaszki. W odpowiednich punktach (A=5,7 mm od Bregmy i L=1,6 mm w zgodzie z atlasem Paxinosa i Watsona (1986)) wywiercono otwory w czaszce, przez które zostały wysysane opuszki węchowe. Procedurę wysysania usunięcia opuszek wykonano za pomocą kapilary podłączonej do pompy próżniowej. Powstałe na skutek wiercenia otwory w czaszce zamknięto za pomocą hemostatycznego spongostanu, hamując jednocześnie krwawienie. U zwierząt kontrolnych przeprowadzono tzw. pozorowaną operację, która polegała na wywierceniu otworu w czaszce i zatamowaniu krwawienia spongostanem (tzw. zwierzęta Sham). Po wykonaniu operacji oraz przez dwa dni po niej zwierzętom podawano podskórną działający przeciwzapalnie i przeciwbólowo metoksykam w dawce 0.05 mg/kg masy ciała. W następnym etapie zoperowane zwierzęta pogrupowano po cztery w klatkach. W każdej klatce znajdowały się po dwa szczury kontrolne i dwa szczury z usuniętymi opuszkami węchowymi. Przez kolejne 14 dni tak podzielone zwierzęta pozostawiono w klatkach w celu unormowania się zmian behawioralnych wynikłych z przeprowadzonej operacji.

3. Podanie leków

Po dwóch tygodniach od operacji usunięcia opuszek węchowych zwierzęta zostały podzielone na pięć grup. Każda z pięciu grup składała się z dwóch podgrup. Do jednej podgrupy należały zwierzęta, którym usunięto opuszki węchowe, natomiast do drugiej zwierzęta, na których przeprowadzono tylko pozorną operację. Po pogrupowaniu zwierząt na odpowiednie grupy rozpoczęto podawanie leków. Leki były podawane przez 14 dni raz dziennie w godzinach 8⁰⁰ do 10⁰⁰. W zależności od grupy eksperymentalnej zwierzęta otrzymywały sól fizjologiczną, amitryptylinę (Sigma Aldrich) w dawce 10mg/kg bądź jedną z trzech dawek jonów magnezu. Dawki 10, 15 i 20 mgMg/kg masy ciała były podawane w postaci wodorooasparagianu magnezu (Farmapol). Leki podawano dootrzewnowo w objętości 1 ml/kg masy ciała. 24 godziny po ostatnim podaniu leku wykonano test wolnego pola. Podawanie wszystkich leków było kontynuowane do następnego dnia. Dwa dni po wykonaniu testu wolnego pola przeprowadzono test biernego unikania, po którym zwierzęta także otrzymały leki.

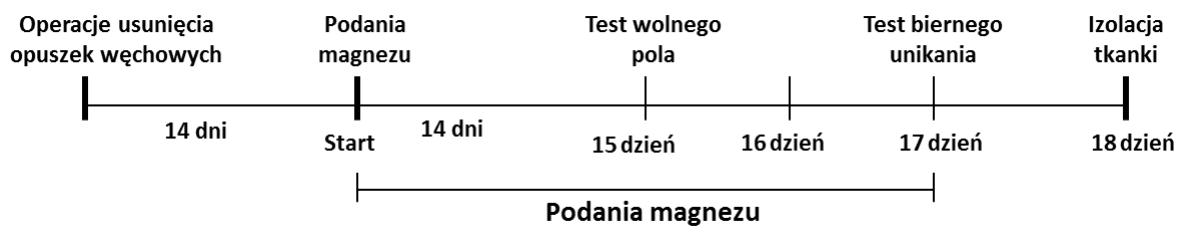
4. Test biernego unikania

Test biernego unikania przeprowadzono według procedury opisanej w pracy Nowak i wsp. 2003. Do eksperymentu użyto aparatu, który składał się z sześciennego pojemnika, otwartego od góry, o wymiarach 50cm x 50cm x 50cm. Dno aparatu pokrywały w odstępach 1,2-centymetrowych metalowe pręty z umieszczoną pośrodku drewnianą platformą o wymiarach 12cm x 12 cm x 3cm. Podczas eksperymentu szczury pojedynczo umieszczano na drewnianej platformie. Szczurom, które schodziły z platformy i czterema łapami dotykały metalowych prętów, aplikowano bodziec prądem o czasie trwania jednej sekundy i natężeniu 0,75mA. Następnie zwierzę było odstawiane na 30 sekund do domowej klatki, po czym eksperyment powtarzano. Taki cykl był powtarzany aż do momentu, w którym zwierzę pozostawało przez minutę na drewnianej platformie, wyskakiwało z aparatu bądź liczba 15 prób nie była wystarczająca do nabycia odruchu biernego unikania.

5. Test wolnego pola

Test przeprowadzono na podstawie procedury opisanej w pracy Nowak i wsp. 2003. W zaciemnionym pomieszczeniu umieszczono aparat, który składał się z platformy w kształcie koła o średnicy 90cm, podzielonej na kwadraty. Przez cały czas trwania eksperymentu środek platformy był oświetlany przez światło lampy o mocy 60W umieszczonej 90cm nad platformą. Zwierzęta były

umieszczane pojedynczo pośrodku koła i pozostawiane na 3 minuty na platformie. W tym czasie obserwowano zachowania eksploracyjne, których miarą była liczba ambulacji.



Rycina 6. Poszczególne etapy modelu bulbektomii

3.3 Oznaczanie poziomu białka – metoda *western blotting*

1. Przygotowanie tkanki

24 godziny po podaniu ostatniej dawki leków (zarówno w modelu bulbektomii, jak i w chronicznym łagodnym stresie) zwierzęta zostały zabite przez dekapitację, a ich mózgi pobrane. Za każdym razem izolowano hipokamp, ciało migdałowe i korę przedczołową (ang. *prefrontal cortex*, PFC). Po wyizolowaniu, tkanki zostały zamrożone na suchym lodzie, a następnie przechowywane w temperaturze 80°C. W następnym etapie poszczególne tkanki zostały zhomogenizowane na lodzie w 2-procentowym roztworze dodecylosiarczanu sodu (SDS). Ciało migdałowe zawieszono w 0,5 ml, hipokamp w 1,25 ml, a PFC w 1,5 ml 2-procentowego roztworu dodecylosiarczanu sodu. W kolejnym etapie homogenaty poddano denaturacji w temperaturze 95°C przez okres 10 minut. Zdenaturowane homogenaty wirowano w wirówce z prędkością 10000 obrotów na minutę przez 10 minut w temperaturze 4°C. Po zakończeniu wirowania z każdej próbki zebrano supernatant.

2. Otrzymany supernatant rozcieńczano 10-krotnie 2-procentowym roztworem SDS i umieszczano w dwóch powtórzeniach na plastikowej mikropłytkce. Obok próbek zawierających tkankę, w której oznaczano zawartość białka, na płytkę nałożono odpowiednio próbki z 2-, 1-, 0,5- i 0,25-procentowym roztworem albuminy. Próbki te służyły za roztwory wzorcowe dla prowadzonych oznaczeń. W kolejnym etapie przygotowano kwas bitynchoinowy według instrukcji zawartej w zestawie Pierce BCA Protein Assay. Tak sporządzony reagent dodano w objętości 200 µl do każdego dołka zawierającego albo oznaczaną tkankę, albo roztwór wzorcowy. Płytkę następnie przykryto i odstawiono do inkubacji trwającej 30 minut w temperaturze 37°C. Po 30 minutach za pomocą spektrofotometru przy długości fali 562 nm zmierzono absorbancję każdej próbki znajdującej się na płytce. Uzyskany wynik był proporcjonalny do zawartości białka w badanej próbce.

3. Elektroforetyczny rozdział białek w SDS żelu poliakrylamidowym i elektrotransfer z żelu na membranę nitrocelulozową

W celu przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego białek przygotowano rozdzielające żele poliakrylamidowe 10- lub 12-procentowe oraz poliakrylamidowy żel zagęszczający w plastikowych kasetkach (Bio Rad). Następnie do każdej studzienki żelu zagęszczającego nakładano objętość próbki, w której znajdowało się 50 mikrogramów białka. Kasetki z nałożonymi na żel próbkami umieszczono w komorze do elektroforezy (Bio Rad) do elektroforezy. Początkowo elektroforezę prowadzono przy

napięciu równym 90V. Gdy czoło elektroforezy przeszło z żelu zagęszczającego do rozdzielającego, napięcie zwiększono do 120V i kontynuowano proces rozdzielu. Po zakończeniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzano elektrotransfer rozdzielonych białek na membranę nitrocelulozową (Ivitrogen) z użyciem aparatu Bio Rad. Elektrotransfer prowadzono przez godzinę, używając prądu o natężeniu 300mA.

Wykrywany antygen	Typ przeciwciała	Firma	Numer	Zastosowane rozcieńczenie
Anty-GluN1	królicze	Abcam	ab28669	1:500
Anty-GluN2A	królicze	Abcam	ab14596	1:1000
Anty-GluN2B	królicze	Abcam	ab65783	1:1000
Anty-GluA1	królicze	Abcam	ab31232	1:1000
Anty-P-S831-GluA1	królicze	Abcam	ab76321	1:1000
Anty-P-S845-GluA1	królicze	Abcam	ab109464	1:1000
Anty-GluA2	mysie	Abcam	ab106515	1:1000
Anty-BDNF	mysie	Santa Cruz	sc-546	1:500
Anty-GAD-67	mysie	Milipore	MAB-5406	1:7000
Anty-aktyna	mysie	Milipore	MAB-1501	1:10000
Anty-PSD-95	kozie	Abcam	ab12093	1:1000

Tabela 1. Spis używanych w badaniach przeciwciał pierwszorzędowych

4. Immunodetekcja badanych białek

Nitrocelulozowe membrany zablokowano w 1-procentowym roztworze odczynnika pochodzącego z zestawu BM Chemiluminescence Western blotting Kit Mouse Rabbit Roche. Następnie membrany inkubowano przez kilkanaście godzin z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi (lista przeciwciał w tabeli 1). Po zakończeniu inkubacji membrany przepłukiwano 3-krotnie po 15 minut w buforze TBST i odstawiano na 30 minut do blokowania z przeciwciałami drugorzędowymi. Jako przeciwciał drugorzędowych używano przeciwciała Anty-mysie/Anty-królicze, 1:7000, Chemiluminescence Western Blotting Kit Mouse Rabbit Roche, znakowane peroksydazą chrzanową. Po inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi membrany płukano 4-krotnie po 5 minut w buforze TBST. W ostatnim etapie wizualizowano badane antygeny. By to wykonać, membrany przenoszono do roztworu zawierającego substrat dla enzymu sprzężonego z przeciwciałem (Chemiluminescence KIT – Roche), a następnie z powierzchni blotów rejestrowano emisję chemiluminescencji za pomocą analizatora Fuji-LAS 1000 (FujiFilm, Tokio, Japonia), równocześnie rejestrując i analizując obraz za pomocą oprogramowania Image Reader i Image Gauge 4.0 (FujiFilm). Ostatecznie każdy otrzymany wynik był stosunkiem pomiędzy optyczną gęstością poszczególnego białka a optyczną gęstością β -aktyny.

3.4 Oznaczanie poziomu mRNA – RT-PCR

1. Izolacja RNA

Całkowity RNA w korze przedczołowej oraz hipokampie poszczególnych zwierząt izolowano metodą Chomczynskiego (Chomczynski 1993), przy użyciu odczynnika TRIzol (Invitrogen). Tkanki zalewano 1 ml TRIzolu i homogenizowano w urządzeniu TissueLyser (Qiagen). Do homogenatów dodawano po 0,2 ml chloroformu (Sigma-Aldrich), wstrząsano je energicznie przez 15 sekund, a następnie wirowano ($12000 \times g$, 15 min, 4°C). Górną wodną fazę zawierającą RNA przenoszono do nowych probówek, do których dodawano następnie po 0,5 ml 100-procentowego izopropanolu (Sigma-Aldrich). Po zwirowaniu ($12000 \times g$, 10 min, 4°C) usuwano nadsącz, a powstałe pelety RNA zalewano 1 ml 75-procentowego etanolu (POCH), delikatnie zwirowano, używając wirówki typu wortex i znów wirowano ($7500 \times g$, 5 min, 4°C). Po odlaniu etanolu pelety RNA suszono w komorze laminarnej przez 5-10 minut, po czym rozpuszczano je w 60 μl wody wolnej od RNaz (Sigma-Aldrich). Integralność otrzymanego RNA potwierdzano, wykonując rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących w 1-procentowym żelu agarozowym. Czystość oraz koncentrację RNA mierzono w spektrofotometrze Nanodrop (Thermo Scientific).

2. Odwrotna transkrypcja

W celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń genomowym DNA 1 μg RNA każdej próbki zawieszony w 8 μl wody trawiono enzymem DNaza (Sigma-Aldrich), a następnie przepisywano na jednoniciowy cDNA przy użyciu zestawu odczynników do odwrotnej transkrypcji High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w 20 μl objętości, stosując zalecane przez producenta warunki inkubacji: 25°C – 10 min, 37°C – 120 min, 85°C – 5 min. Do każdej serii właściwych reakcji odwrotnej transkrypcji dołączano dwa rodzaje kontroli negatywnych:

- a) bez dodania RNA,
- b) zawierające RNA, ale bez dodania enzymu odwrotnej transkryptazy.

3. PCR z detekcją w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*)

Reakcje PCR z detekcją w czasie rzeczywistym przeprowadzono w urządzeniu CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) w 96-dółkowych płytkach optycznych (Bio-Rad).

Poziom transkrypcji genów podjednostek GluN2A i GluN2B receptora NMDA mierzono z wykorzystaniem barwnika SYBR Green, który wiąże się do dwuniciowych cząsteczek DNA w kolejnych cyklach reakcji PCR, emitując fluorescencję o natężeniu proporcjonalnym do ilości powstającego produktu.

Reakcje przeprowadzano w objętości 18 μ l, na którą składało się:

- a) 1,8 μ l cDNA (rozcieńczonego 10-krotnie wodą)
- b) 9 μ l 2 $\times$ Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)
- c) 0,36 μ l startera “forward” (10 pM/ μ l) (Applied Biosystems)
- d) 0,36 μ l startera “reverse” (10 pM/ μ l) (Applied Biosystems)
- e) 6,48 μ l wody

Sekwencje starterów obu badanych genów oraz genu GAPDH będącego kontrolą endogenną przedstawiono w tabeli 2. Reakcje przebiegały w następujących warunkach:

- a) aktywacja polimerazy: 95°C, 10 min
- b) 40 cykli składających się z 2 etapów:
 - denaturacji DNA: 95°C, 15 s
 - przyłączania i elongacji starterów: 60°C, 1 min
- c) wyznaczenie krzywej topnienia w zakresie temperatur: od 60°C do 95°C z odczytem fluorescencji po kolejnych wzrostach temperatury o 0,5°C.

gen	starter “forward” (5'→3')	starter “reverse” (5'→3')	ID sekwencji	długość produktu PCR
NMDA2A	ACATTGCAGAAGCTGCCTTT	TTCTGTGACCAGTCCTGCTG	NM_012573.3	186 bp
NMDA2B	GTGAGAGCTCCTTTGCCAAC	TGAAGCAAGCACTGGTCATC	NM_012574.1	157 bp
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	NM_017008.3	207 bp

Tabela 2. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcjach *real-time PCR*

Poziom transkrypcji genów *Mt1a*, *Mt2A* i *Mt3* mierzono z wykorzystaniem zestawów TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) zawierających specyficzne dla danego genu startery oraz sondę wyznakowaną na końcu 5' fluorochromem FAM, a na końcu 3' cząsteczką MGB (*minor groove binder*) wygaszającą fluorescencję. Sonda jest degradowana przez polimerazę w kolejnych cyklach PCR, co prowadzi do nasilania się siły fluorescencji w miarę przyrostu liczby kopii syntetyzowanego produktu. Reakcje przeprowadzano w objętości 10 μ l, na którą składało się:

- a) 3 μ l cDNA (rozcieńczonego 20-krotnie wodą)
- b) 5 μ l 2 $\times$ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)
- c) 0,5 μ l TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)
- d) 1,5 μ l wody

Numery identyfikacyjne użytych zestawów TaqMan Gene Expression Assay podano w tabeli 3. Reakcje PCR przebiegały w następujących warunkach:

- a) aktywacja polimerazy: 95°C, 10 min
- b) 40 cykli składających się z 2 etapów:
 - denaturacji DNA: 95°C, 15 s
 - przyłączania i elongacji starterów: 60°C, 1 min

gen	numer identyfikacyjny zestawu	długość produktu PCR
<i>Mt1a</i>	Rn00821759_g1	88 bp
<i>Mt2A</i>	Rn01536588_gH	87 bp
<i>Mt3</i>	Rn00588658_g1	58 bp
<i>Gapdh</i>	Rn01775763_g1	175 bp

Tabela 3. Numery identyfikacyjne zestawów TaqMan Gene Expression Assay wykorzystanych w reakcjach RT-PCR

Wszystkie reakcje (zarówno z barwnikiem SYBR Green, jak i z sondami TaqMan) przeprowadzano w trzech powtórzeniach, dla których obliczano średnią wartość C_T (*threshold cycle*, cykl, w którym fluorescencja osiągnęła ustaloną wartość progową). Następnie dla każdej próbki cDNA wykonywano następujące obliczenie: od wartości C_T dla genów badanych odejmowano wartość C_T dla genu GAPDH.

W ten sposób uzyskiwano wartości ΔC_T normalizujące poziom transkryptów genów badanych względem poziomu transkryptu genu referencyjnego (GAPDH) i eliminujące różnice pomiędzy próbkami, które wynikały jedynie z różnej ilości cDNA dodawanego do reakcji PCR. Na końcu stosowano formułę $2^{-\Delta C_T}$ (Livak i Schmittgen 2001), a otrzymane w ten sposób wartości stanowiły podstawę analizy statystycznej oraz graficznej prezentacji wyników (Livak i Schmittgen. 2001).

3.5 Oznaczenie poziomu magnezu w surowicy

Do badań wykorzystano surowicę pobraną od dekapitowanych szczurów z modeli bulbektomii i chronicznego łagodnego stresu. Badanie przeprowadzono w następujących grupach zwierząt:

a) model bulbektomii

- NaCl Sham
- NaCl OB.
- Mg15 Sham
- Mg15 OB.

b) model chronicznego łagodnego stresu

- NaCl kontrola
- NaCl stres
- Mg15 kontrola
- Mg15 stres

Stężenie magnezu wyznaczono za pomocą metody kolorymetrycznej z użyciem chlorofosfonazo-III za pomocą analizatora Cobas C – 501. Oznaczone stężenie magnezu podano w mg/l.

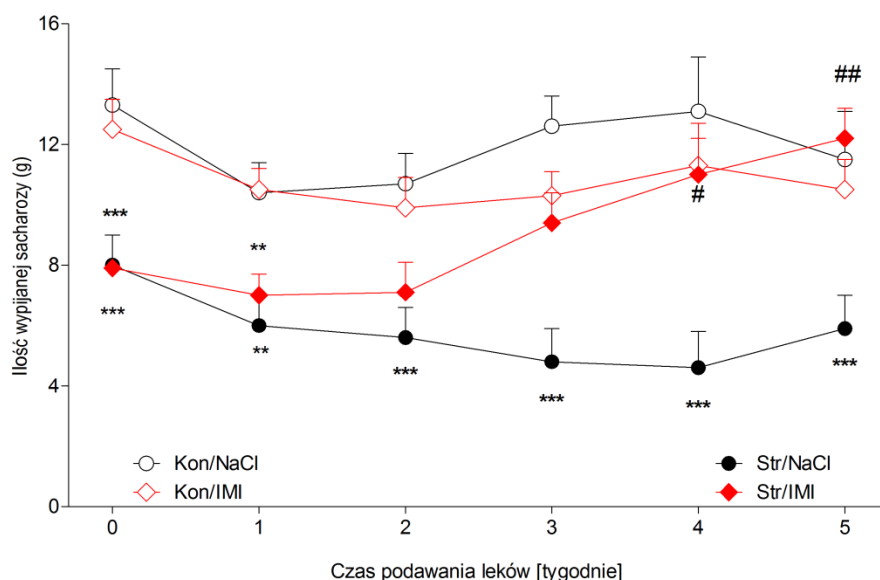
Rozdział 4

Chroniczny łagodny stres – opracowanie wyników

4.1 Badania behawioralne – chroniczny łagodny stres

1. Przeciwdepresyjna aktywność leku referencyjnego – imipraminy w teście picia sacharozy w modelu chronicznego łagodnego stresu

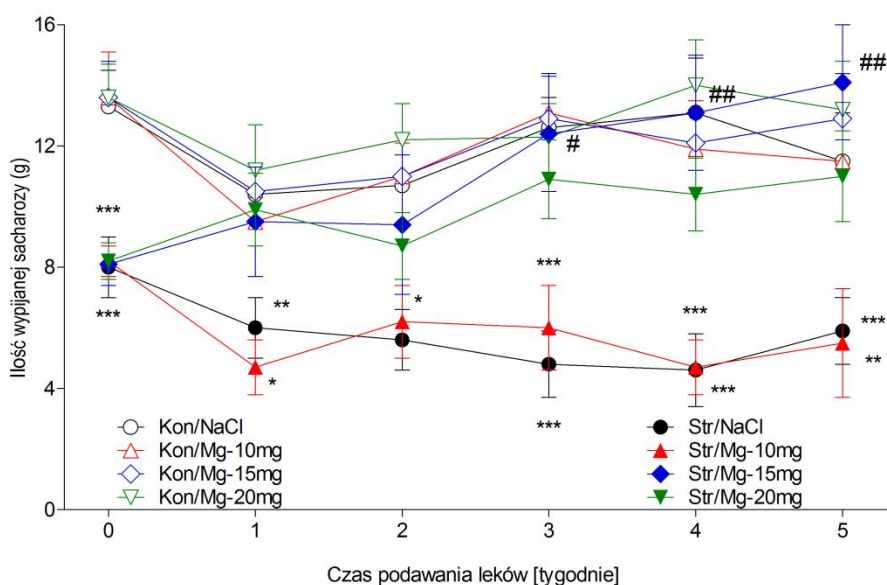
Po dwóch tygodniach stresu spożycie 1-procentowego roztworu sacharozy w grupie szczurów narażonych na stresujące bodźce było istotnie statystycznie mniejsze niż w grupie kontrolnej (rycina 7, tydzień 0). Po czterech tygodniach podawania imipraminy w dawce 10 mg/kg zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost spożycia sacharozy u szczurów stresowanych (rycina 7, tydzień 3). Zwiększone spożycie sacharozy u zwierząt stresowanych, którym podawano przez cały czas imipraminę, utrzymywało się przez kolejny tydzień trwania eksperymentu (rycina 7, tydzień 5). Chroniczne podanie imipraminy u zwierząt kontrolnych pozostawało bez wpływu na poziom wypijanego roztworu sacharozy.



Rycina 7. Aktywność imipraminy w teście picia 1-procentowego roztworu sacharozy w modelu chronicznego łagodnego stresu. Wyniki zaprezentowano jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=8. Do wyznaczenia znamienności statystycznych posłużyły wieloczynnikowa analiza wariancji oraz test LSD Fishera. **p<0.01 vs. Kon/NaCl i vs. Kon/IMI, ***p<0.001 vs Kon/NaCl i vs. Kon/IMI, #p<0.05 vs. Str/IMI w 0 tygodniu, ##p<0.01 vs. Str/IMI w 0 tygodniu

2. Przeciwdepresyjna aktywność jonów magnezu w dawkach 10, 15 i 20 mgMg/kg w teście picia sacharozy w modelu chronicznego łagodnego stresu

Dwutygodniowe nastawienie szczurów na bodźce stresujące w statystycznie istotny sposób obniżało ilość wypijanego 1-procentowego roztworu sacharozy (rycina 8, tydzień 0). Jony magnezu w postaci wodorooasparaginianu magnezu w dawce 15 mgMg/kg po trzech tygodniach chronicznego podawania z istotnością statystyczną zwiększały spożycie 1-procentowego roztworu sacharozy w grupie zwierząt wystawionych na stresujące bodźce (rycina 8, tydzień3). Tendencja ta utrzymywała się przez kolejne dwa tygodnie podawania tej dawki magnezu. Jony magnezu w dawkach 10 i 20 mgMg/kg podawane w grupie zwierząt stresowanych nie miały statystycznie istotnego wpływu na poziom spożywanej sacharozy. Aczkolwiek przy dawce 20 mg/Mg/kg odnotowano tendencję wzrostową. Jednocześnie nie zaobserwowano istotnych zmian w spożyciu sacharozy u zwierząt kontrolnych, które przez cały czas trwania eksperymentu otrzymywały jedną z dawek magnezu.

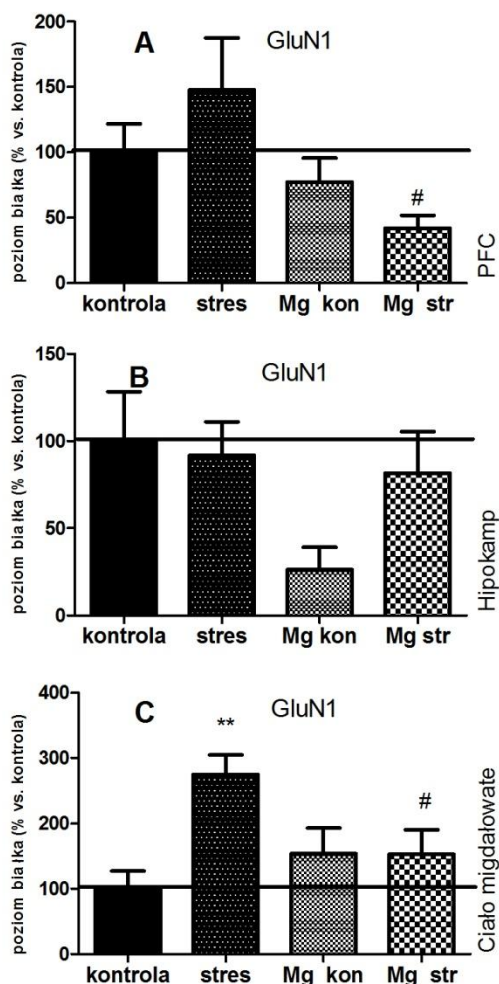


Rycina 8. Aktywność jonów magnezu w dawkach 10, 15 i 20 mgMg/kg w teście picia sacharozy w modelu chronicznego łagodnego stresu. Wyniki zaprezentowano jako $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupie N=8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji i testu LSD Fishera. * $p < 0.05$ vs. Kon/NaCl i Kon/MgX; X=10, 15 lub 20mgMg/kg), ** $p < 0.01$ vs. Kon/NaCl i vs. Kon/MgX, *** $p < 0.001$ vs. Kon/NaCl i Kon/MgX, # $p < 0.05$ vs. Str /Mg w 0 tygodniu, ## $p < 0.01$ vs. Str/Mg w 0 tygodniu

4.2 Badania biochemiczne – chroniczny łagodny stres

1. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom białka podjednostki GluN1 receptora NMDA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

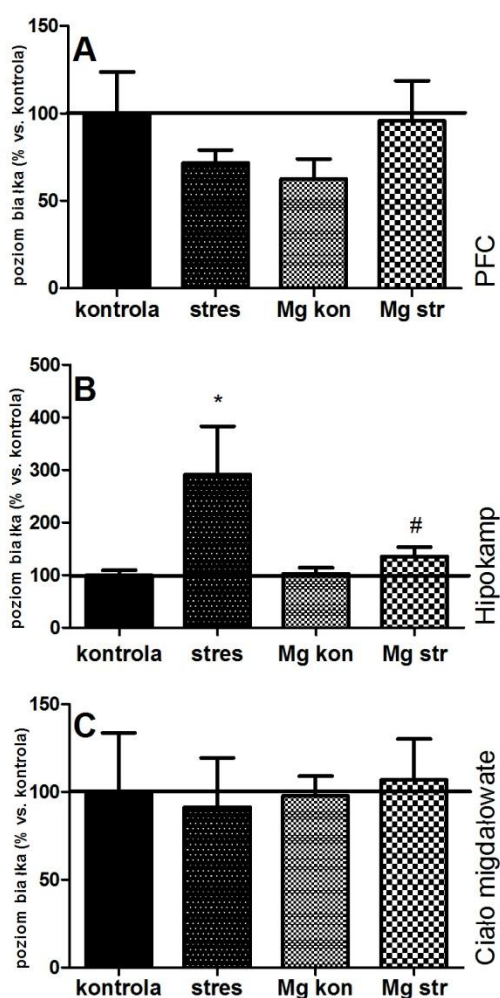
Chroniczny łagodny stres prowadził do statystycznie istotnego wzrostu ekspresji podjednostki GluN1 receptora NMDA w ciele migdałowatym (rycina 9C). Chroniczne podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu magnezu w dawce 15 mgMg/kg u zwierząt stresowanych pozwoliło obniżyć poziom podjednostki GluN1. Ponadto jony magnezu podawane u zwierząt narażonych na bodźce stresowe obniżały poziom podjednostki GluN1 w korze przedfronatalnej w stosunku do grupy stresowanej otrzymującej sól fizjologiczną (rycina 9A).



Rycina 9. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom ekspresji podjednostki GluN1 receptora NMDA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola) ** $p < 0.01$ vs. kontrola, # $p < 0.05$ vs. stres

2. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom białka podjednostki GluN2A receptora NMDA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

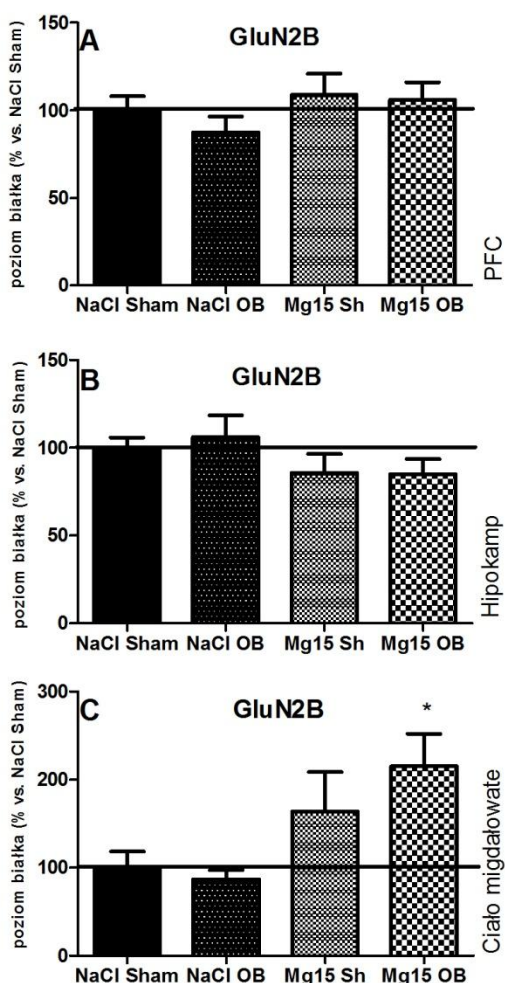
Chroniczny łagodny stres prowadził do istotnego statystycznie wzrostu ekspresji podjednostki GluN2A receptora NMDA w hipokampie. Jony magnezu chronicznie podawane w postaci wodorooasparagianu magnezu w dawce 15 mgMg/kg normalizowały wzrost ekspresji podjednostki GluN2A do poziomu grupy kontrolnej (rycina 10B). W pozostałych strukturach nie odnotowano zmian w ekspresji podjednostki GluN2A ani po chronicznym łagodnym stresie, ani po podaniach jonów magnezu.



Rycina 10. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom ekspresji podjednostki GluN2A receptora NMDA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola) * $p < 0.05$ vs. kontrola., # $p < 0.05$ vs. stres

3. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom białka podjednostki GluN2B receptora NMDA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

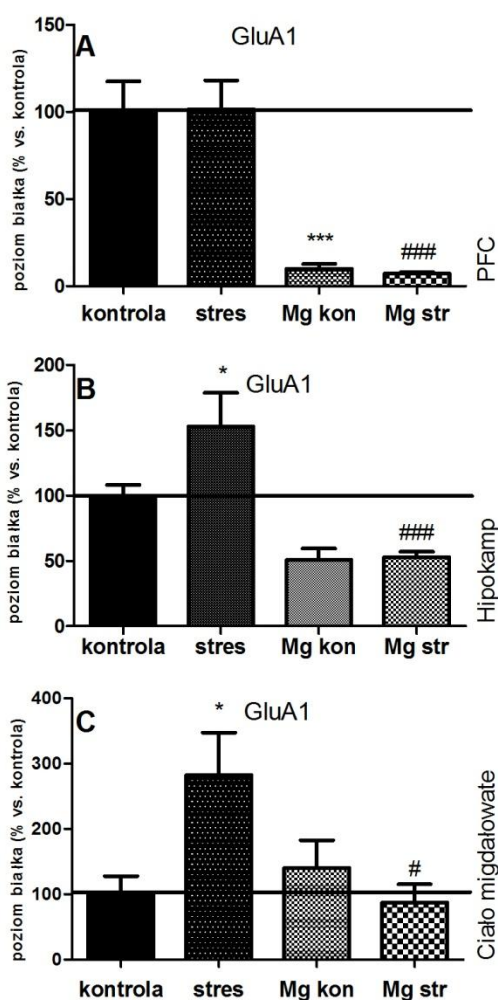
Chroniczny łagodny stres w żadnej z zbadanych struktur nie zmieniał poziomu podjednostki GluN2B receptora NMDA. Podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu w dawce 15 mgMg/kg zwierzętom stresowanym w statystycznie istotny sposób podwyższało poziom badanego białka w korze przedfrontalnej (rycina 11A). W pozostałych strukturach podanie jonów magnezu nie miało wpływu na ekspresję podjednostki GluN2B zarówno u zwierząt stresowanych i kontrolnych.



Rycina 11. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom ekspresji podjednostki GluN2B receptora NMDA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola), #p<0.05 vs. stres

4. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom białka podjednostki GluA1 receptora AMPA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

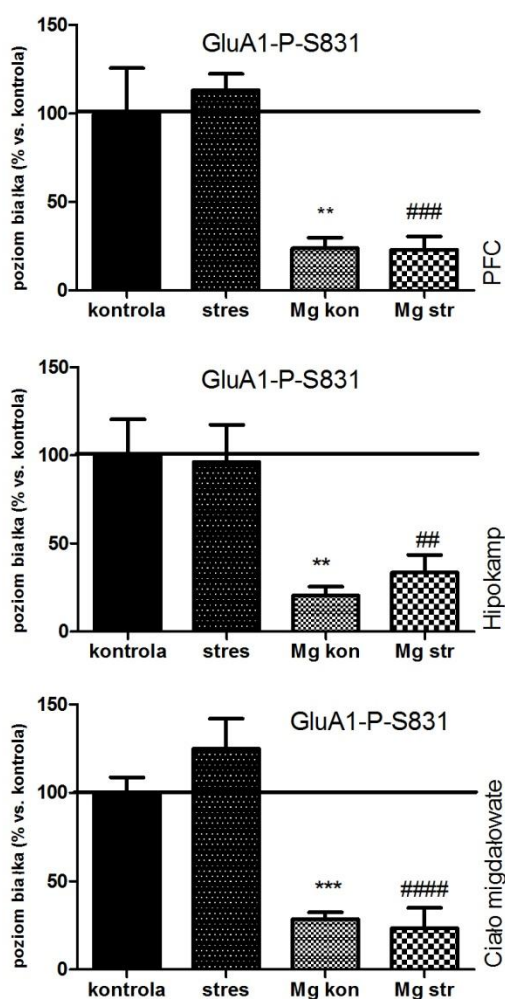
Chroniczny łagodny stres prowadził do istotnie statystycznego wzrostu poziomu białka podjednostki GluA1 receptora AMPA w hipokampie i ciele migdałowatym (ryciny 12 B i 12C). Podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu normalizowało u zwierząt stresowanych ekspresję GluA1 zarówno w hipokampie, jak i w ciele migdałowatym. Ponadto jony magnezu przyczyniały się do bardzo znaczącego spadku ekspresji podjednostki GluA1 w korze przedczołowej w obu grupach – zwierząt kontrolnych i stresowanych (rycina 12A).



Rycina 12. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom ekspresji podjednostki GluA1 receptora AMPA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znaczenia statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola), * $p < 0.05$ vs. Kontrola, # $p < 0.05$ vs. stres, *** $p < 0.001$ vs. Kontrola, ### $p < 0.001$ vs. stres

5. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom fosforylacji seryny 831 podjednostki GluA1 receptora AMPA w korze przedfrontalnej, hipokampie i ciele migdałowatym

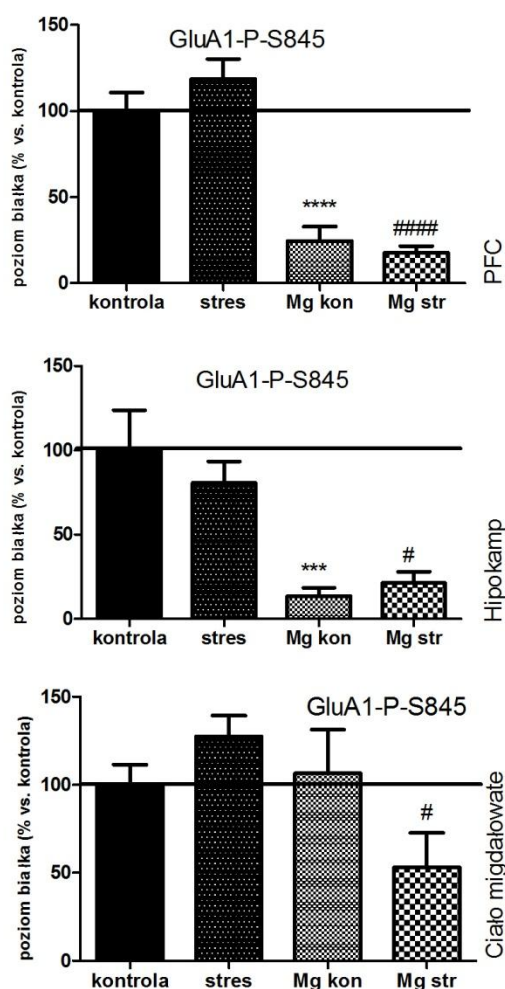
W żadnej ze zbadanych struktur u zwierząt poddanych procedurze chronicznego łagodnego stresu nie odnotowano zmian w fosforylacji seryny 831 podjednostki GluA1 receptora AMPA. Co ciekawe, podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu w dawce 15mgMg/kg u zwierząt kontrolnych w statystycznie istotny sposób obniżało poziom fosforylacji w stosunku do grupy kontrolnej we wszystkich strukturach (rycina 13 A, B i C). Podobną zależność odnotowano pomiędzy grupą stresowaną, której podawano jony magnezu, i grupą stresowaną otrzymującą sól fizjologiczną.



Rycina 13. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom fosforylacji seryny 831 podjednostki GluA1 receptora AMPA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki fosforylacji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola), ** $p < 0.01$ vs., *** $p < 0.001$ vs. kontrola, ## $p < 0.01$ vs. stres, ### $p < 0.001$ vs. stres, #### $p < 0.0001$ vs. stres

6. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom fosforylacji seryny 845 podjednostki GluA1 receptora AMPA w korze przedfrontalnej, hipokampie i ciele migdałowatym

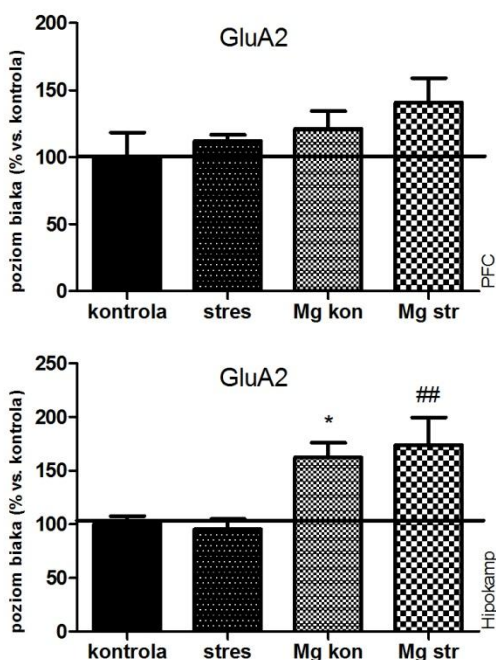
Chroniczny łagodny stres nie przyczyniał się w statystycznie istotny sposób do zmian w fosforylacji seryny 845 podjednostki GluA1 receptora AMPA. W korze przedfrontalnej i ciele migdałowatym zaobserwowano wzrostową tendencję w ufosforylowaniu seryny 845, jednak bez statystycznej znamienności. Ponadto podawanie jonów magnezu zwierzętom poddanym procedurze chronicznego łagodnego stresu w znamienny statystycznie sposób obniżało poziom fosforylacji badanego białka we wszystkich badanych strukturach w stosunku do grupy stresowanej otrzymującej sól fizjologiczną. Analogiczne sytuacje odnotowano w korze przedfrontalnej i hipokampie zwierząt kontrolnych otrzymujących jony magnezu. Podobny profil działania jonów magnezu nie wystąpił w ciele migdałowatym zwierząt kontrolnych.



Rycina 14. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom fosforylacji seryny 845 podjednostki GluA1 receptora AMPA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki fosforylacji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola), *** $p < 0.001$ vs., **** $p < 0.0001$ vs. kontrola, # $p < 0.05$ vs. stres #### $p < 0.0001$ vs. stres

7. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom białka podjednostki GluA2 receptora AMPA w korze przedczołowej i hipokampie

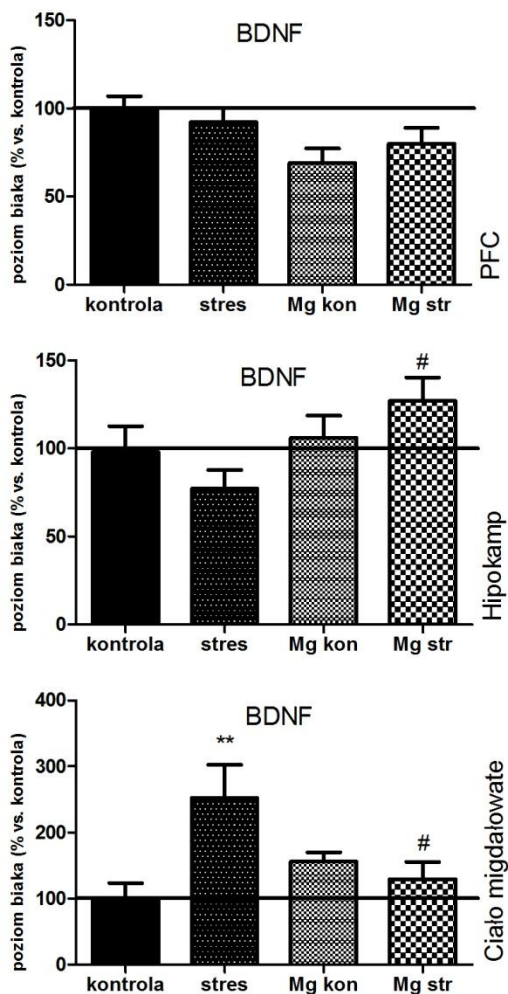
Chroniczny łagodny stres nie powodował istotnych zmian w ekspresji białka GluA2 ani w hipokampie, ani korze przedczołowej. Jednocześnie podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparaginianu w dawce 15 mgMg/kg w znaczący statystycznie sposób podwyższało poziom badanej podjednostki w hipokampie zarówno zwierząt kontrolnych, jak i stresowanych (rycina 15 B). Podobne tendencje wystąpiły także w korze przedczołowej, jednak bez istotności statystycznej (rycina 15 A).



Rycina 15. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom ekspresji podjednostki GluA2 receptora AMPA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola), * $p < 0.05$ vs. kontrola, ## $p < 0.01$ vs. stres

8. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom białka BDNF w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

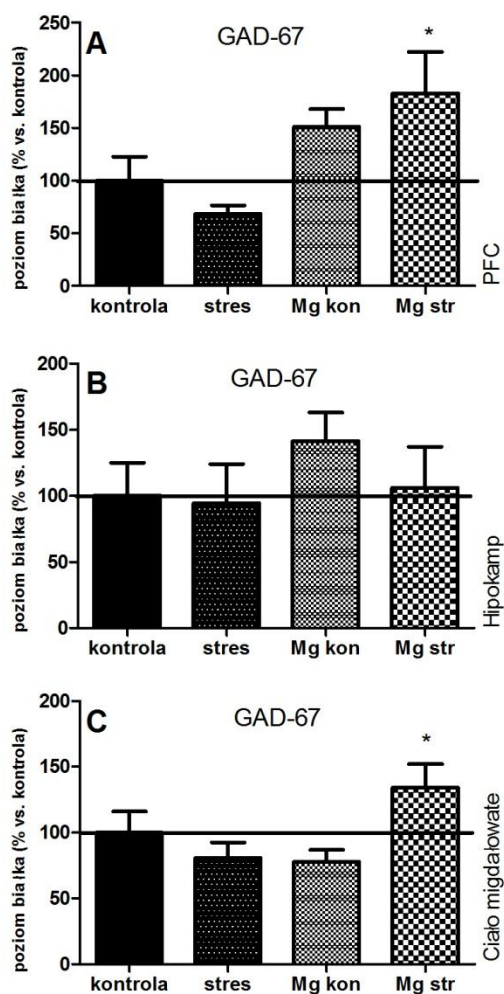
Efekt chronicznego łagodnego stresu na poziom BDNF był zróżnicowany. W hipokampie i korze przedczołowej nie odnotowano żadnych statystycznie istotnych zmian. Natomiast chroniczny łagodny stres prowadził do wzrostu ekspresji BDNF w ciele migdałowatym (rycina 16 C). Chroniczne podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu magnezu istotnie statystycznie podnosiło poziom badanego białka w hipokampie szczurów poddanych stresowi w stosunku do zwierząt stresowanych otrzymujących sól fizjologiczną (rycina 16 B). Ponadto jony magnezu podawane zwierzętom narażonym na stres obniżały z istotnością statystyczną poziom BDNF w ciele migdałowatym (rycina 16 C).



Rycina 16. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom ekspresji BDNF. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola), **p<0.01 vs. kontrola, #p<0.05 vs. stres

9. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom białka GAD-67 w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

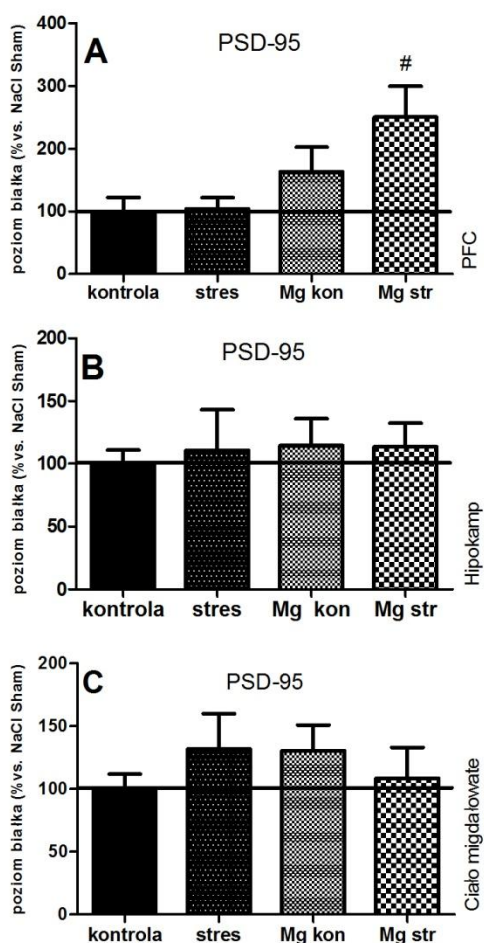
Zwierzęta poddane chronicznemu łagodnemu stresowi miały normalną ekspresję GAD-67 we wszystkich badanych strukturach. Chroniczne podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparaginianu magnezu w dawce 15 mgMg/kg podwyższało poziom badanego białka w korze przedczołowej i ciele migdałowatym w stosunku do grupy poddanej stresowi otrzymującej sól fizjologiczną (rycina 17 A i C).



Rycina 17. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom ekspresji GAD-67. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola), #p<0.05 vs. stres

10. Wpływ chronicznego łagodnego stresu i chronicznego podawania jonów magnezu na poziom białka PSD-95 w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

Procedura chronicznego łagodnego stresu nie prowadziła do istotnych statystycznie różnic w ekspresji białka PSD-95 w badanych strukturach. Chroniczne traktowanie zwierząt stresowanych jonami magnezu w postaci wodorooasparagianu magnezu w dawce 15 mgMg/kg pozostawało bez istotnego wpływu na poziom ekspresji PSD-95 w hipokampie i ciele migdałowatym. Jednocześnie jony magnezu w korze przedczołowej zwierząt narażonych na bodźce stresowe w statystycznie istotny sposób podwyższały poziom PSD-95 w stosunku do zwierząt stresowanych otrzymujących sól fizjologiczną (rycina 18 A).



Rycina 18. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i chronicznego łagodnego stresu na poziom ekspresji PSD-95. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (kontrola), [#]p<0.05 vs. stres

11. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu i chronicznego łagodnego stresu na poziom jonów magnezu w surowicy szczurów

Chroniczny łagodny stres nie prowadził do statystycznie istotnych zmian w stężeniu magnezu w surowicy. Natomiast podanie jonów magnezu redukuje stężenie magnezu w surowicy krwi zwierząt stresowanych w porównaniu do zwierząt stresowanych otrzymujących sól fizjologiczną.

Grupa zwierząt	Stężenie magnezu (mg/l)
NaCl stres	19.50 ± 0.2474
Mg15 kontrola	19.30 ± 0.3092
NaCl stres	19.34 ± 0.1267
Mg15 stres	$18.31 \pm 0.2757 *$

Tabela 4. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu na poziom magnezu w surowicy w modelu chronicznego łagodnego stresu. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA oraz testu Bonferroni. * $p < 0.05$ vs. NaCl kontrola

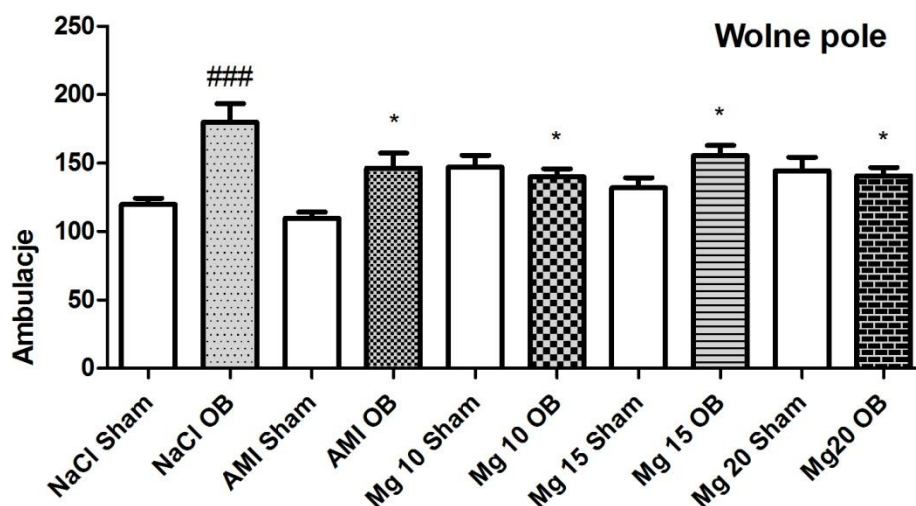
Rozdział 5

Bulbektomia – opracowanie wyników

5.1 Badania behawioralne – bulbektomia

1. Przeciwdepresyjne działanie jonów magnezu w teście wolnego pola

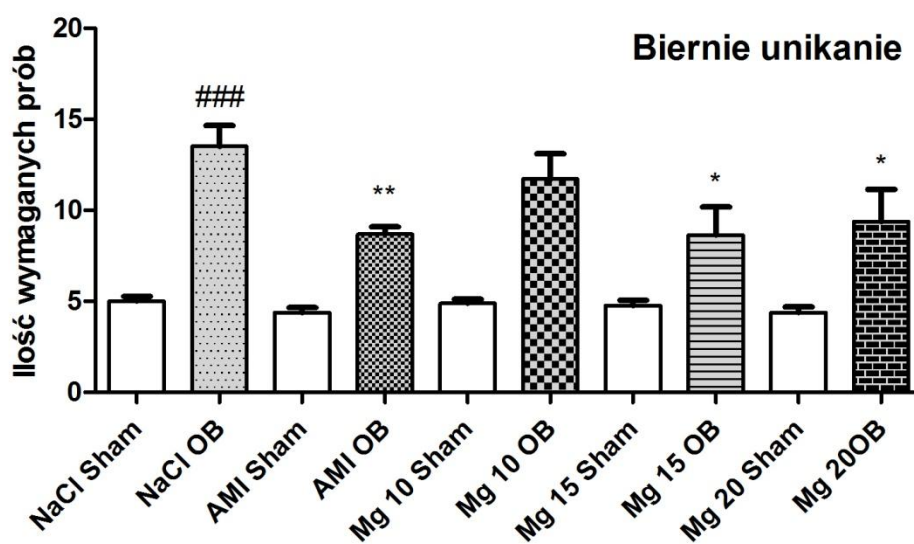
Operacja obustronnego usunięcia opuszek węchowych w istotny sposób spowodowała zwiększenie ruchliwości zwierząt w teście wolnego pola. Miarą ruchliwości była liczba zmierzonych ambulacji. Chroniczne podawanie amitryptyliny oraz jonów magnezu w postaci wodorooasparagianiu magnezu w dawkach 10, 15 i 20 mgMg/kg masy ciała obniżało liczbę ambulacji u zwierząt OB. Efekt obserwowany po amitryptylinie i po jonach magnezu był podobny. Chroniczne podanie leków u szczurów Sham nie spowodowało obserwowalnych zmian behawioralnych w teście wolnego pola.



Rycina 19. Wpływ chronicznego podawania amitryptyliny i jonów magnezu w dawkach 10, 15 i 20 mgMg/kg masy ciała na ruchliwość w teście wolnego pola w modelu obustronnego usunięcia opuszek węchowych. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Newman-Keuls. ### $p < 0.001$ vs. NaCl Sham, * $p < 0.05$ vs. NaCl OB

2. Przeciwdepresyjne działanie jonów magnezu w teście biernego unikania

Obustronne usunięcie opuszek węchowych wyraźnie obniżyło zdolność do nabywania odruchu biernego unikania. U szczurów OB znacząco wzrosła ilość prób wymaganych do nauczenia się unikania bodźca elektrycznego. Chroniczne podanie amitryptyliny u szczurów OB istotnie statystycznie zmniejszało liczbę prób potrzebną do nabycia odruchu biernego unikania. Jony magnezu podawane chronicznie w postaci wodorooasparagianu magnezu w dawce 15 i 20 mgMg/kg w podobnym nasileniu jak lek referencyjny normalizowały behawioralny defekt odruchu biernego unikania u zwierząt OB. Dawka magnezu 10 mgMg/kg nie wykazała podobnej aktywności. U zwierząt z pozorowaną operacją (Sham) podanie magnezu oraz amitryptyliny nie spowodowało żadnych obserwowalnych zmian.

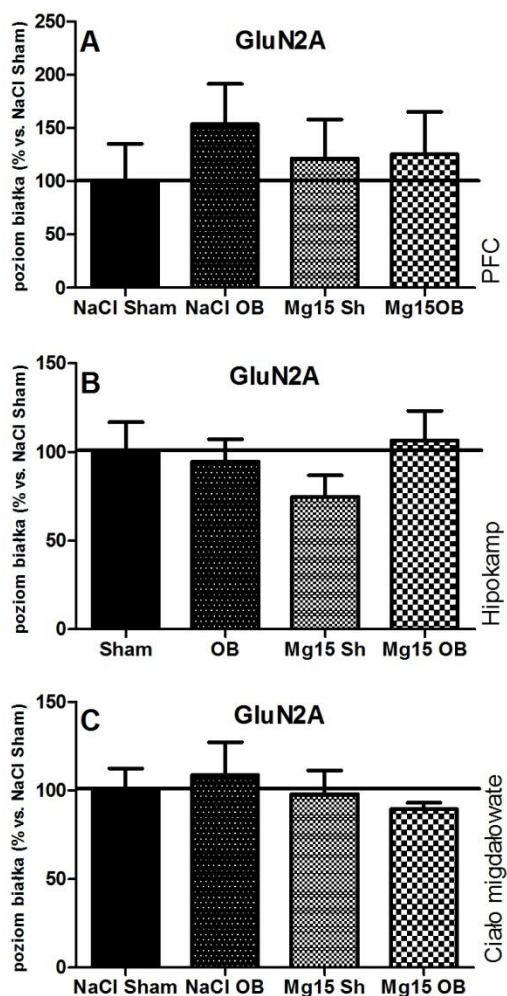


Rycina 20. Wpływ chronicznego podawania amitryptyliny i jonów magnezu w dawkach 10, 15 i 20 mg/Mg/kg na nabywanie odruchu biernego unikania w modelu obustronnego usunięcia opuszek węchowych. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Newman-Keuls. ### $p < 0.001$ vs. NaCl Sham, * $p < 0.05$ vs. NaCl OB, ** $p < 0.01$ vs. NaCl OB

5.2 Badania biochemiczne – bulbektomia

1. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom białka podjednostki GluN2A receptora NMDA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

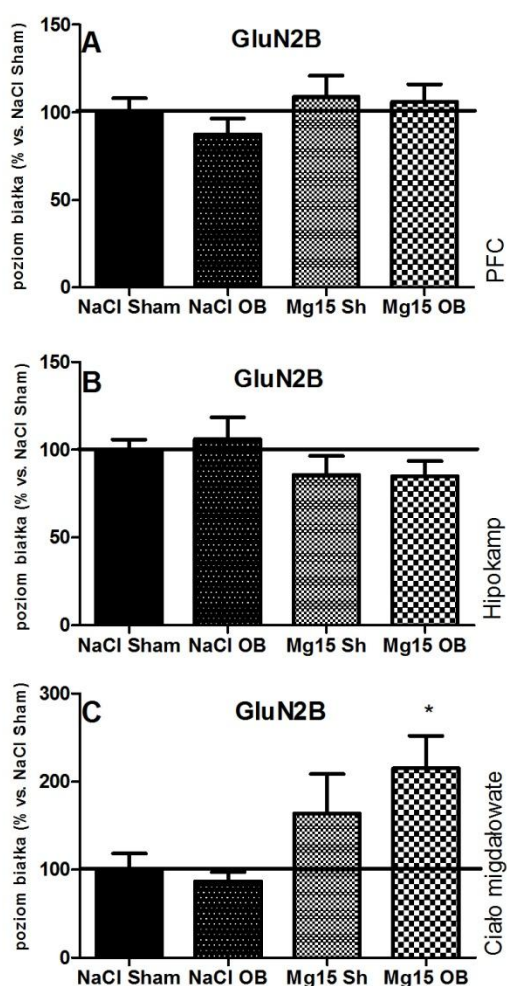
Usunięcie opuszek węchowych nie spowodowało istotnych zmian w poziomie podjednostki GluN2A w żadnej z badanych struktur. Podawanie wodorooasparagianu magnezu w dawce 15 mgMg/kg również nie zmieniało ekspresji podjednostki GluN2A w badanych strukturach mózgu, ani u zwierząt kontrolnych, ani u operowanych.



Rycina 21. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom podjednostki GluN2A receptora NMDA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej (NaCl Sham)

2. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom białka podjednostki GluN2B receptora NMDA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

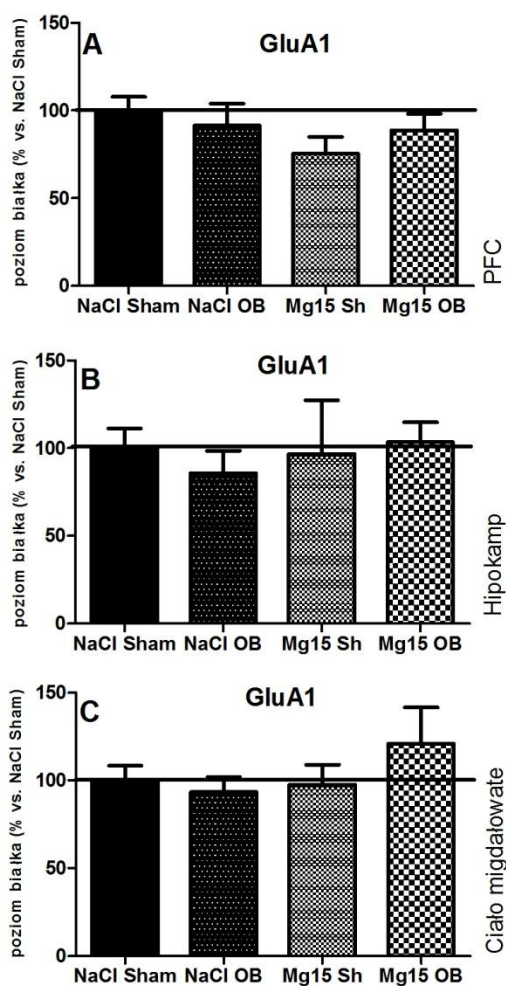
Usunięcie opuszek węchowych nie prowadziło do zmian w ekspresji podjednostki GluN2B receptora NMDA w żadnej z badanych struktur. Podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu magnezu w dawce 15 mgMg/kg prowadziło do istotnego statystycznie wzrostu ekspresji podjednostki GluN2B w ciele migdałowatym u szczurów OB (rycina 22 C).



Rycina 22. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom podjednostki GluN2B receptora NMDA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji w grupie kontrolnej(NaCl Sham). * $p < 0.05$ vs. NaCl OB

3. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom białka podjednostki GluA1 receptora AMPA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

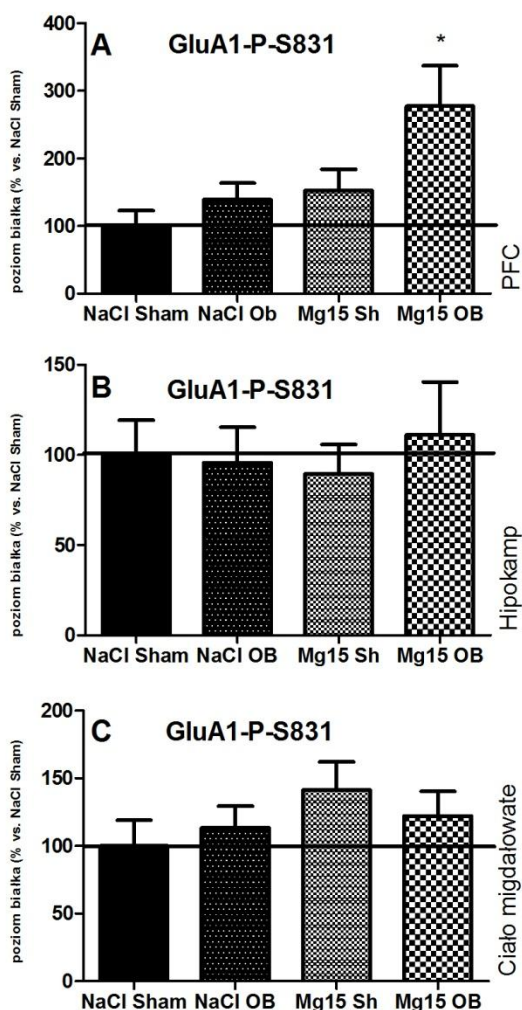
Usunięcie opuszek węchowych nie spowodowało istotnych zmian w poziomie podjednostki GluA1 w żadnej ze zbadanych struktur. Podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu magnezu w dawce 15mgMg/kg również nie zmieniało ekspresji podjednostki GluA1 w badanych strukturach mózgu, ani u zwierząt kontrolnych, ani u operowanych.



Rycina 23. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom podjednostki GluA1 receptora AMPA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent grupy kontrolnej (NaCl Sham)

4. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom ufosforylowanej seryny 831 podjednostki GluA1 receptora AMPA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

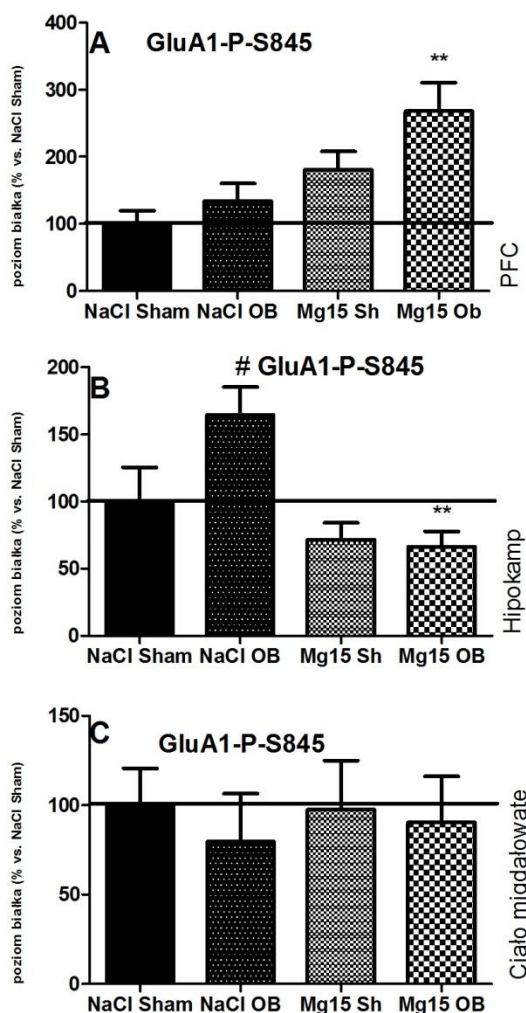
Po usunięciu opuszek węchowych nie zaobserwowano istotnych różnic w fosforylacji seryny 831 podjednostki GluA1 receptora AMPA w żadnej z badanych struktur. Chroniczne podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparaginianu magnezu w dawce 15mgMg/kg prowadziło do statystycznie istotnego wzrostu ufosforylowania seryny 831 podjednostki GluA1 w korze przedczołowej (rycina 24 A) szczurów OB.



Rycina 24. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom ufosforylowania seryny 831 podjednostki GluA1 receptora AMPA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji grupy kontrolnej (NaCl Sham) * $p < 0.05$ vs. NaCl OB

5. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom ufosforylowanej seryny 845 podjednostki GluA1 receptora AMPA w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

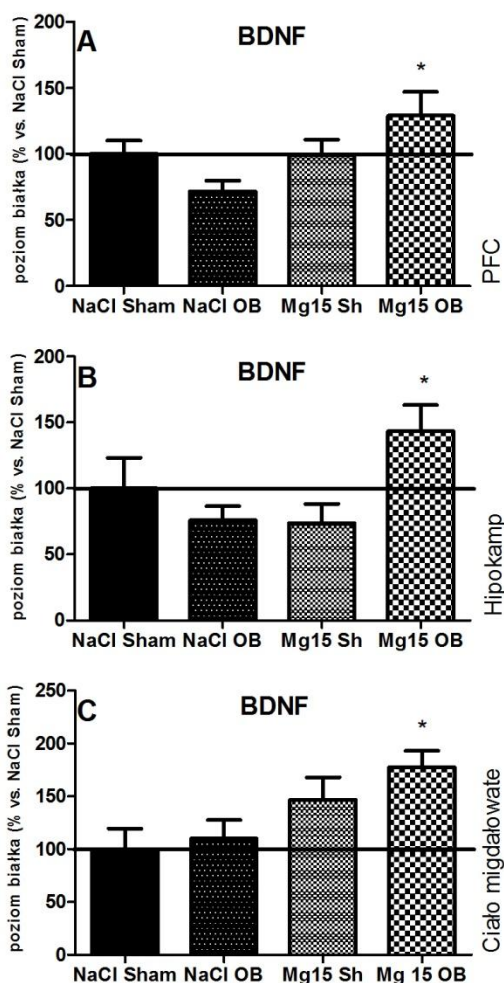
Usunięcie opuszek węchowych nie powodowało istotnych zmian w fosforylacji seryny 845 podjednostki GluA1 receptora AMPA w korze przedczołowej i ciele migdałowatym. Natomiast w hipokampie u zwierząt OB odnotowano istotny statystycznie wzrost ufosforylowania badanego białka (rycina 25 B). Podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu magnezu w dawce 15mgMg/kg masy zmniejszało stopień fosforylacji do poziomu zwierząt kontrolnych. Ponadto w korze przedczołowej jony magnezu podawane szczurom OB istotnie statystycznie podwyższały poziom ufosforylowanego białka (rycina 25 A).



Rycina 25. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom ufosforylowania seryny 845 podjednostki GluA1 receptora AMPA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent fosforylacji w grupie kontrolnej (NaCl Sham) **p<0.01vs. NaCl OB, #p<0.05 vs. NaCl Sham

6. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom ekspresji białka BDNF w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

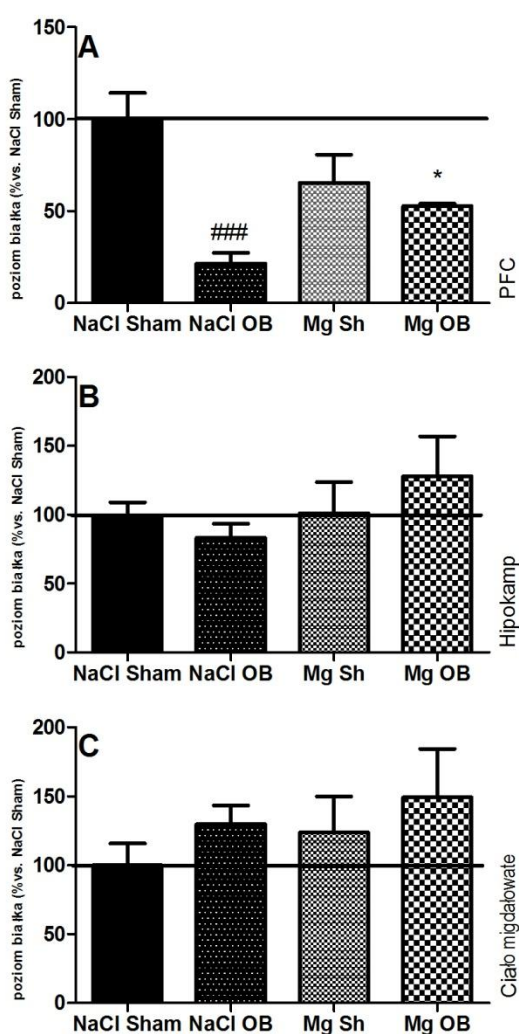
Operacja usunięcia opuszek węchowych nie prowadziła do istotnych zmian w poziomie BDNF w żadnej z badanych struktur. Jednakże chroniczne podawanie jonów magnezu w postaci wodorasparaginyanu magnezu w dawce 15mgMg/kg istotnie zwiększało ekspresję BDNF u szczurów OB w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym (ryciny 26 A, B i C).



Rycina 26. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom ekspresji BDNF. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji grupy kontrolnej (NaCl Sham) * $p < 0.05$ vs. NaCl OB

7. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom ekspresji białka GAD-67 w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

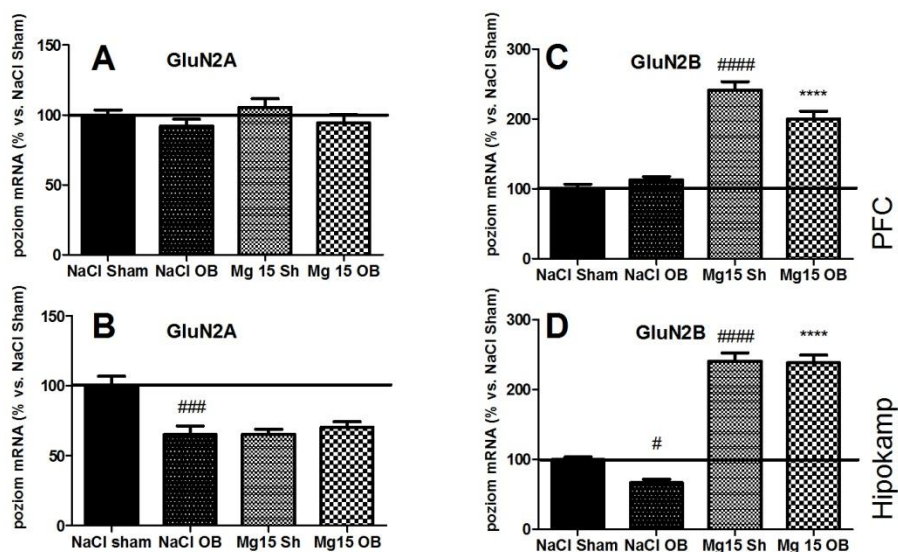
Operacja usunięcia opuszek węchowych w statystycznie znamienny sposób obniżała poziom GAD-67 w korze przedczołowej szczurów OB. Jednocześnie podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparagianu w dawce 15 mgMg/kg normalizowało poziom GAD-67 w grupie zwierząt z usuniętymi opuszkami węchowymi (rycina 27 A). Nie odnotowano podobnych zmian w hipokampie i ciele migdałowatym (ryciny 27 B i 27 C).



Rycina 27. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15mgMg/kg i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom ekspresji GAD-67. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Wyniki ekspresji białka przedstawiono jako procent ekspresji grupy kontrolnej (NaCl Sham) * $p < 0.05$ vs. NaCl OB., ### $p < 0.001$ vs. NaCl Sham

8. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom mRNA podjednostek GluN2A i GluN2B receptora NMDA w korze przedczołowej i hipokampie

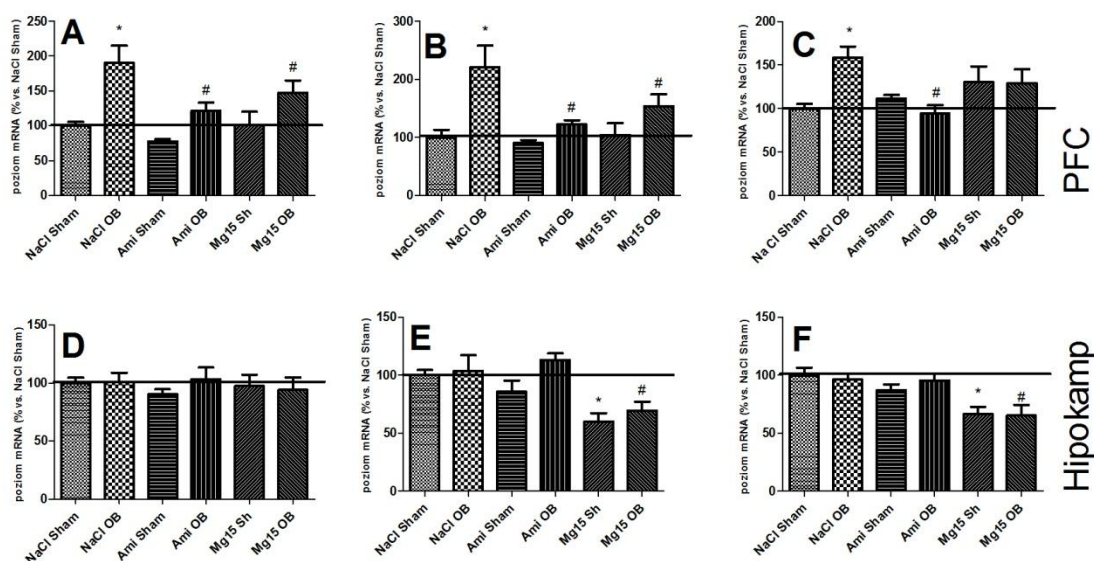
Operacja usunięcia opuszek węchowych istotnie statystycznie obniżała poziom mRNA podjednostek GluN2A (rycina 28 B) i GluN2B (rycina 28 D) w hipokampie. Podawanie jonów magnezu w postaci wodorooasparginianu magnezu w dawce 15 mgMg/kg masy ciała nie normalizowało poziomu mRNA podjednostki GluN2A w hipokampach szczurów OB. W przypadku podjednostki GluN2B podanie jonów magnezu wywoływało bardzo wyraźny wzrost mRNA w hipokampie zwierząt OB. Ponadto podanie jonów magnezu w bardzo znamieny sposób podnosiło ekspresję mRNA podjednostki GluN2B w hipokampie zwierząt Sham oraz w korze przedczołowej zwierząt Sham oraz OB (odpowiednio ryciny 28 C i 28 D).



Rycina 28. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg masy ciała i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom mRNA podjednostek GluN2A i GluN2B receptora NMDA. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Poziom mRNA jest podany jako procent ekspresji mRNA grupy kontrolnej (NaCl Sham). #p<0.05 vs. NaCl Sham, ###p<0.001 vs. NaCl Sham, ####p<0.0001 vs. NaCl Sham, ****p<0.0001 vs. NaCl OB

9. Wpływ bulbektomii i chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg na poziom mRNA metalotionein 1, 2 i 3 w korze przedczołowej i hipokampie

Operacja bulbektomii istotnie zwiększała ekspresję mRNA dla MT-1, MT-2 i MT-3 w korze przedczołowej oraz MT-2 w hipokampie (rycina 29 A, B, C oraz rycina 29 E). Chroniczne podawanie jonów magnezu u zwierząt OB obniżało poziom MT-1 i MT-2 w PFC, oraz MT-2 i MT-3 w hipokampie w stosunku do zwierząt OB otrzymujących sól fizjologiczną (ryciny 29 A i B oraz 29 E i F). Jednocześnie podobna relacja między grupą NaCl a Ami OB zachodziła w przypadku MT-1, MT-2, MT-3 w PFC oraz MT-2 w hipokampie. Ponadto podanie jonów magnezu istotnie statystycznie obniżało poziom MT-3 u zwierząt Sham w stosunku do grupy NaCl Sham.



Rycina 29. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu w dawce 15 mgMg/kg masy ciała i operacji usunięcia opuszek węchowych na poziom mRNA MT-1, MT-2, MT-3 w PFC i hipokampie. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=6-8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA i testu Bonferroni. Poziom mRNA jest podany jako procent ekspresji mRNA grupy kontrolnej (NaCl Sham). *p<0.05 vs. NaCl Sham, #p<0.05 vs. NaCl OB

10. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu i bulbektomii na poziom jonów magnezu w surowicy szczurów

Operacja bulbektomii nie wywarła istotnie statystycznego wpływu na poziom magnezu w surowicy. Natomiast podanie jonów magnezu u szczurów OB redukowało stężenie magnezu w surowicy krwi w stosunku do stężenia magnezu w surowicy szczurów NaCl OB (tabela 5).

Grupa zwierząt	Stężenie magnezu (mg/l)
NaCl Sham	18.5 ± 0.28
Mg15 Sham	18.8 ± 0.50
NaCl OB	19.5 ± 0.33
Mg15 OB	17.9 ± 0.62 *

Tabela 5. Wpływ chronicznego podawania jonów magnezu na poziom magnezu w surowicy w modelu bulbektomii. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. Liczebność zwierząt w grupach N=8. Znamienności statystyczne wyznaczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA oraz testu Bonferroni. *p<0.05 vs. NaCl OB

Rozdział 6

Dyskusja wyników

6.1 Dyskusja wyników – chroniczny łagodny stres

1. Model chronicznego łagodnego stresu – tło teoretyczne

Teoretyczną podstawą modelu chronicznego łagodnego stresu jest jego podobieństwo do ludzkiej depresji w dwóch istotnych aspektach. Po pierwsze, geneza zaburzeń behawioralnych obserwowanych u zwierząt laboratoryjnych ma w pewnej mierze odzwierciedlać komponentę chronicznego stresu, która jest istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia depresji. Po drugie, następstwem stosowanych u szczurów bodźców stresowych winny być zaburzenia behawioralne analogiczne do behawioralnych dysfunkcji diagnozowanych u pacjentów z depresją. W modelu chronicznego łagodnego stresu zwierzęta traktowane są bodźcami stresogennymi w sposób naprzemienny i nieprzerwany, co ostatecznie spełnia drugi z wymienionych postulatów teoretycznych prowadząc do szeregu zaburzeń behawioralnych, które w jakiejś mierze przypominają objawy depresji. Wydaje się, że szczególnie ważna w kontekście potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej badanej substancji jest możliwość zredukowania przez tę substancję dysfunkcji behawioralnej, która, po pierwsze, została wygenerowana przez bodźce, mogące przypominać bodźce prowadzące do depresji ludzkiej, a po drugie, jest analogiczna do tej obserwowanej u chorych ludzi. Jednym z najpoważniejszych następstw chronicznego łagodnego stresu odnotowywanych u zwierząt poddanych tej procedurze jest obniżenie spożycia 1-procentowego roztworu sacharozy w stosunku do zwierząt kontrolnych. Przyjmuje się, że zmniejszona atrakcyjność słodkiego roztworu cukru może naśladować osiowy objaw depresji ludzkiej – anhedonię (Willner i wsp. 1992; Willner. 2005).

To, że obniżone spożycie roztworu sacharozy po chronicznym łagodnym stresie może być analogiczną dysfunkcją behawioralną do ludzkiej anhedonii, a w najgorszym wypadku jakimś markerem zaburzeń przypominającym depresję u ludzi, jest w sposób pośredni także potwierdzane przez skuteczność licznych leków przeciwdepresyjnych w teście picia sacharozy. Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne po kilku tygodniach podania wykazują efekt przeciwdepresyjny, zwiększając spożycie sacharozy u szczurów stresowanych (Kubera i wsp. 1996; Sowa-Kućma i wsp. 2008). Nowsze leki przeciwdepresyjne, jak fluoksetyna czy citalopram, wywołują przeciwdepresyjny efekt w sacharozowym

teście odpowiednio po trzech i dwóch tygodniach stosowania (Sánchez i wsp. 2003). Cynk, który jest antagonistą receptora NMDA i który można traktować jako substancję atypową o aktywności przeciwdepresyjnej, daje obserwowalny efekt w teście sacharozowym po jednym tygodniu stosowania (Sowa-Kućma i wsp. 2008). Natomiast ketamina – syntetyczny antagonist receptoru NMDA, co prawda w nieco innym układzie eksperymentalnym, tj. chronicznego nieprzewidywalnego stresu, już po podaniu jednej dawki odwraca obniżone spożycie sacharozy (Li i wsp. 2011).

Rozpatrując wyniki badań pod względem czasu potrzebnego do zaobserwowania efektów przeciwdepresyjnych w teście picia sacharozy, można stwierdzić, że na pierwszy plan wysuwają się przede wszystkim różnice pomiędzy poszczególnymi antagonistami NMDA. Cynk, który podobnie jak magnez jest endogennym regulatorem aktywności receptorów NMDA, ujawnia swą aktywność już dwa tygodnie wcześniej (Sowa-Kućma i wsp. 2008). Spośród wielu możliwych przyczyn prowadzących do odmiennego działania cynku i magnezu warto wskazać na to, że obydwa pierwiastki mają różne miejsca wiązania na receptorze NMDA (Szewczyk i wsp. 2012), co może przyczyniać się do aktywacji odrębnych szlaków efektorowych. Jest także prawdopodobne, że kinetyka przekraczania bariery krew – mózg dla cynku i magnezu jest znacząco inna, co z dużą dozą prawdopodobieństwa nie jest obojętne dla dynamiki zmian przeciwdepresyjnych charakteryzujących obydwie substancje. Gdyby o przeciwdepresyjnej aktywności ketaminy i magnezu decydowała tylko jedna zmienna, mianowicie miejsce wiązania na receptorze NMDA zawierającym podjednostki GluN2A bądź GluN2B, można by oczekiwać, że przeciwdepresyjne efekty obydwu substancji będą w dużej mierze podobne, gdyż jak pokazują badania, miejsce wiązania magnezu i ketaminy wewnątrz kanału jonowego receptora NMDA jest bardzo podobne (Orser i wsp. 1997; Murck. 2013) (Kotermanski i Johnson. 2009). Wyniki naszych badań dotyczące czasu wystąpienia efektu przeciwdepresyjnego jonów magnezu w teście picia sacharozy w modelu chronicznego łagodnego stresu (Pochwat i wsp. 2013) i wyniki dotyczące innych antagonistów uzyskane przez Lie i wsp. (z ketaminą) (Li i wsp. 2011) czy Quana i wsp. (z memantyną) (Quan i wsp. 2011) wskazują, że z pewnością istnieją różnice jakościowe bądź ilościowe w mechanizmach przeciwdepresyjnych powyższych antagonistów receptora NMDA.

2. Chroniczny łagodny stres – wyniki biochemiczne

Badania biochemiczne w modelu chronicznego łagodnego stresu z teoretycznej perspektywy powinny umożliwić, po pierwsze, poznanie molekularnego podłoża zmian behawioralnych będących

konsekwencją przewlekłego stresu, i po drugie, zrozumienie mechanizmów molekularnych, które odpowiadają za przeciwdepresyjną aktywność badanej substancji.

W związku z tym, że w literaturze przedmiotu opisano zależność pomiędzy stresem, ludzką depresją a zaburzeniami strukturalno-funkcjonalnymi kory przedczołowej, hipokampa i ciała migdałowatego (Whalen i wsp. 2002; Campbell i wsp. 2004; Lemogne i wsp. 2012), a także odnotowano w pośmiertnych badaniach zaburzenia na poziomie neuroprzekaźników czy czynników neurotropowych w wyżej wymienionych strukturach mózgu u pacjentów chorych na depresję (Karolewicz i wsp. 2009; Karolewicz i wsp. 2010a; Sher. 2011), do badań biochemicznych wybrano korę przedczołową, hipokamp i ciało migdałowate szczura. Jako markery zmian w układzie glutaminianergicznym wybrano podjednostki GluN1, GluN2A i GluN2B receptora NMDA, podjednostki GluA1 i GluA2 receptora AMPA oraz ufosforylowane podjednostki GluA1 P-S831 i P-S845. Dodatkowo badano poziom białka gęstości synaptycznej PSD-95, BDNF i białko „z pogranicza” układów glutaminianergicznego i GABA-ergicznego, GAD-67. Celem tych prac było określenie, czy procedura stresu zastosowana w naszych badaniach prowadzi do zmian w układzie glutaminianergicznym w wybranych strukturach mózgu szczura oraz czy podawanie aktywnej w teście picia sacharozy dawki jonów magnezu jest skorelowane ze zmianami ekspresji wybranych przez nas białek. Takie postępowanie pozwoliło uzyskać odpowiedź, przynajmniej częściową, na pytanie, na ile proces normalizowania zmian behawioralnych poprzez substancję o właściwościach potencjalnie przeciwdepresyjnych jest prostym odwracaniem zmian na poziomie molekularnym, a na ile może on zależeć od aktywacji nowych mechanizmów, niekoniecznie bezpośrednio zaangażowanych w ekspresję zachowań spowodowanych przez chroniczny przewlekły stres.

3. Wpływ stresu na wybrane białka w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym

Jak wspomniano wyżej, strukturą mózgu, która jest szczególnie narażona na uszkodzenia z powodu chronicznego stresu, jest hipokamp. Pamiętając jednocześnie, że układ glutaminianergiczny może być szczególnie zaangażowany w proces uszkodzania neuronów na drodze ekscytotoksyczności, można było przypuszczać, że w tej strukturze pomiędzy zwierzętami kontrolnymi a stresowanymi mogą pojawić się istotne różnice w ekspresji analizowanych białek. Te przewidywania potwierdziły się tylko w przypadku podjednostek GluN2A receptora NMDA oraz GluA1 receptora AMPA, których poziom u zwierząt stresowanych był istotnie statystycznie podwyższony w stosunku do szczurów kontrolnych. Bazując na danych zawartych w literaturze przedmiotu, które podają, że myszy *knock-out* pozbawione podjednostki

GluN2A w teście wymuszonego pływania (FST) przejawiają zachowania, które mogą wskazywać na fenotyp przeciwdepresyjny (Boyce-Rustay i Holmes. 2006), można było sądzić, że nadmierna ekspresja podjednostki GluN2A może mieć udział w ekspresji zaburzeń behawioralnych u zwierząt stresowanych. Należy pamiętać, że badana była tylko ekspresja białka, a na tej podstawie nie można stawiać twierdzeń dotyczących aktywności receptorów zawierających daną podjednostkę.

Wydaje się, że w przypadku podjednostki GluA1 receptora AMPA sytuacja jest nieco mniej jasna. Istnieje szereg badań, które wskazują na kluczowy udział tej podjednostki w generowaniu wczesnego LTP w hipokampie, poprzez wbudowywanie się jej do synapsy i zarazem formowanie homomerycznych receptorów AMPA (Lee i wsp. 2010; Lee i Kirkwood. 2011) kluczowych dla procesów neuroplastyczności – a co za tym idzie fundamentalnych dla efektu leków przeciwdepresyjnych (Mathews i wsp. 2012). Ponadto przeciwdepresyjna aktywność ketaminy, która w ostateczności prowadzi do synaptogenezy, wymaga pobudzenia receptorów AMPA (Li i wsp. 2010). Także bardziej klasyczne leki przeciwdepresyjne, jak fluoksetyna (Svenningsson i wsp. 2002) i imipramina (Du i wsp. 2004a; Du i wsp. 2007; Du i wsp. 2007; Du i wsp. 2008), i nowsze atypowe leki o działaniu przeciwdepresyjnym, jak tianepetyna, swoje terapeutyczne efekty zdają się opierać na aktywacji transmisji glutaminianergicznej poprzez receptory AMPA (Svenningsson i wsp. 2007). Tym samym wzrost ekspresji podjednostki GluA1 w hipokampie zwierząt stresowanych, która wydaje się zaangażowana w efekty przeciwdepresyjne znanych leków, jest w jakiejś mierze zagadkowy. Warto jednak pamiętać, że cały czas myślimy o wzroście ekspresji wszystkich dostępnych w komórce form podjednostki GluA1. Zgodnie z informacjami, które przedstawiono we wstępie niniejszej pracy, funkcjonalny status poszczególnych białek – w tym także podjednostki GluA1 – jest ściśle zależny od licznych, często bardzo subtelnych modyfikacji. O stanie funkcjonalnym podjednostki GluA1, a co za tym idzie o jej rzeczywistym wpływie na procesy zachodzące w komórce nerwowej w dużej mierze decyduje stopień jej ufosforylowania w ściśle określonych miejscach. Wymienia się kilka fosforylacji podjednostki GluA1, ale dwie z nich zostały najlepiej przebadane (Lee i wsp. 2010) i ich biologiczne znaczenie najlepiej poznane. Są to ufosforylowanie reszt seryny S831 i S845. Fosforylacja S845 umożliwia wędrówkę podjednostki GluA1 do przestrzeni okołosynaptycznej i jest jednym z newralgicznych punktów wieloetapowego obrotu podjednostki GluA1 w hipokampie (ang. *multistep trafficking*). Przestrzeń okołosynaptyczna stanowi rezerwar dla podjednostki GluA1, która w kolejnym etapie jest wbudowywana do synapsy. Na dzień dzisiejszy nie wiemy, która modyfikacja jest odpowiedzialna za przemieszczenie podjednostki GluA1 z przestrzeni okołosynaptycznej do synapsy w neuronach hipokampa. Wiemy

natomiast, że P-S831 zwiększa częstotliwość otwierania kanału homomerycznych receptorów GluA1-AMPA i przepuszczalność jonów wapnia, co jest niezbędne dla e-LTP (Derkach i wsp. 2007; Lee i wsp. 2010; Lee i Kirkwood. 2011). Zdając sobie sprawę z tego, w jak ważne procesy neuronalne zaangażowana jest podjednostka GluA1 receptora AMPA, postanowiono zbadać także ufosforylowane S831 i S845 warianty podjednostki GluA1. Wyniki tych badań nie wykazały żadnych istotnych różnic pomiędzy poziomem ufosforylowania S845 i S831 ani u zwierząt kontrolnych, ani u tych poddanych procedurze stresu. Jeśli przyjąć za prawdziwą przesłankę, że te dwie fosforylacje są niezbędne dla procesów neuroplastyczności w hipokampie, a badania z myszami typu *knock-in* pozbawionymi możliwości ufosforylowania obydwu seryn naraz zdają się to potwierdzać (Lee i wsp. 2010), to wydaje się, że wzrost poziomu ekspresji ogólnej liczby podjednostki GluA1 nie musi mieć istotnego znaczenia dla transmisji glutaminianergicznej w hipokampie zwierząt stresowanych. Mówiąc ściślej, trudno przypuszczać, by mógł on mieć udział w generowaniu behawioralnych deficytów, takich jak obniżone spożycie 1-procentowego roztworu sacharozy. Wydaje się, że tę tezę pośrednio wzmacniają także badania z lekami przeciwdepresyjnymi, których chroniczne stosowanie prowadzi przede wszystkim do wzrostu fosforylacji podjednostki GluA1 (Svenningsson i wsp. 2002; Du i wsp. 2004b; Svenningsson i wsp. 2007), a niekoniecznie do wzmożonej ogólnej ekspresji podjednostki GluA1 receptora AMPA. Innymi słowy, nie można z całą stanowczością twierdzić, że wzrost ekspresji podjednostki GluA1 w hipokampach szczurów stresowanych jest w jakiś sposób sprzeczny z tym, co zawierają dane zawarte w literaturaturze przedmiotu mówiące o mechanizmach przeciwdepresyjnych leków i procesów patofizjologicznych prowadzących do rozwoju pełnoobjawowej depresji. Na obecnym etapie badań trudno konkretnie powiedzieć, jakie przyczyny odpowiadają za wzrost ekspresji podjednostki GluA1 w hipokampie.

Dodatkowo z całą stanowczością należy podkreślić, że aktywacja receptorów AMPA jest warunkiem koniecznym, lecz niewystarczającym do uzyskania odpowiedzi przeciwdepresyjnej dla ketaminy (Li i wsp. 2010). Jest także warunkiem koniecznym dla uzyskania odpowiedzi przeciwdepresyjnej w FST dla tianeptyny (Wlaz i wsp. 2011). Przynajmniej w przypadku przeciwdepresyjnego działania ketaminy pobudzenie receptora AMPA jest tylko początkiem wydarzeń, które ostatecznie mają doprowadzić do uwolnienia i syntezy BDNF i synaptogenezy (Li i wsp. 2010; Autry i wsp. 2011; Zhou i wsp.). Nasze badania nie wykazały istotnych zmian w poziomie BDNF w hipokampie szczurów stresowanych, co zdaje się jeszcze bardziej osłabiać hipotezę dotyczącą korelacji pomiędzy wzrostem podjednostki GluA1 a indukowanymi stresem zaburzeniami behawioralnymi. Być może wzrost poziomu podjednostki GluA1 jest

jakimś mechanizmem adaptacyjnym związanym z innymi zdarzeniami molekularnymi wywoływanymi przez stres, lecz w świetle omówionych danych wydaje się, że nie jest on szczególnie istotny dla obserwowalnych zmian behawioralnych.

Wcześniej wspomniano, że układ glutaminianergiczny może być zaangażowany w procesy uszkodzania komórek nerwowych poprzez mechanizmy ekscytotoksyczne. Jednym z takich mechanizmów jest aktywacja produkcji wolnych rodników poprzez pobudzenie pozasynaptycznie zlokalizowanych heterodimerycznych receptorów NMDA zawierających podjednostkę GluN2B skoniugowaną z białkiem PSD-95 i syntazą tlenku azotu (Fan i wsp. 2010; Krystal i wsp. 2013; Paoletti i wsp. 2013). Jednak nasze badania dotyczące ekspresji tych białek w hipokampie szczurów stresowanych, a także w pozostałych strukturach, nie pokazują żadnych takich zależności, a zatem wydaje się, że rola tego szlaku dla behawioralnych dysfunkcji może być nieistotna.

Obok hipokampa strukturą mózgu, która ma równie doniosłe znaczenie w przetwarzaniu bodźców stresowych, jest ciało migdałowe. Jej szczególna fizjologiczna waga wynika choćby z pobudzającego wpływu na komórki jądra przykomorowego podwzgórza, które uwalniają kortykoliberynę (CRH), aktywując tym samym oś HPA (Nestler i wsp. 2002). Jak łatwo zauważyć, jest to efekt przeciwny do aktywności neuronów hipokampa, które hamują uwalnianie CRH z komórek jądra przykomorowego (Nestler i wsp. 2002). Ponadto chroniczny stres w odmienny sposób wpływa na morfologię komórek hipokampa i ciała migdałowego, prowadząc do atrofii hipokampa i rozrostu drzewek dendrytycznych neuronów ciała migdałowego (Vyas i wsp. 2002). Jeśli przewlekłemu stresowi towarzyszą procesy synaptogenezy w ciele migdałowatym, a te z kolei są związane z aktywnością układu glutaminianergicznego oraz z czynnikami neurotrofowymi, między innymi BDNF, można było oczekiwać, że także w naszym modelu stresu te czynniki mogą mieć ważny udział. Jak się okazało, zastosowany w badaniach chroniczny łagodny stres zwiększał ekspresję podjednostki GluN1 receptora NMDA, podjednostki GluA1 receptora AMPA oraz dodatkowo wpływał na syntezę BDNF. Równocześnie nie odnotowano istotnego wpływu stresu na fosorylację podjednostki GluA1 ani wzmożonej ekspresji podjednostek GluN2A i GluN2B. Szczególnie ciekawy, a zarazem zgodny z pewnymi wcześniejszymi ustaleniami dotyczącymi stresu i aktywności ciała migdałowego, może być wzrost ekspresji BDNF. Badania nad molekularnym podłożem następstw stresu unieruchomienia wyraźnie wskazują na podwyższony poziom BDNF w podstawno-bocznym ciele migdałowatym, który utrzymuje się nawet 21 dni po zakończeniu stresowania. Równocześnie w obszarze CA3 hipokampa stres unieruchomienia obniża poziom BDNF, który po 21 dniach wraca do normy

(Lakshminarasimhan i Chattarji. 2012). Jakkolwiek wiadomo, że wzrost ekspresji BDNF nie upoważnia w pełni do postawienia tezy, że mamy do czynienia z nadaktywnością ciała migdałowatego i przerostem jego drzewka dendrytycznego, to na podstawie licznych badań i zależności pomiędzy BDNF a procesami remodelingu synaptycznego może on powyższe wydarzenia sugerować. Warto także wspomnieć, że lezje ciała migdałowatego hamują efekt stresu na funkcjonowanie neuronów hipokampa, zapobiegając upośledzeniu LTP (Kim i wsp. 2001; Kim i wsp. 2005). Dodatkowo lezja ciała migdałowatego prowadzi do przeciwdepresyjnych zachowań w FST (Castro i wsp. 2010). Z jednej strony, wydaje się, że w świetle powyższych badań nadmierna ekspresja podjednostek receptorów glutaminianergicznym i BDNF sugeruje, iż w modelu stresu ciało migdałowe odgrywa centralną rolę w ekspresji zaburzeń behawioralnych. Z drugiej jednak strony, można spodziewać się, że pewne odzwierciedlenie efektów stresu i nadaktywności ciała migdałowatego winno być w jakiś sposób zauważalne na poziomie ekspresji choćby BDNF w hipokampie. Bo wydaje się, że te dwa wydarzenia współwystępują ze sobą. W przeprowadzonych badaniach nie wykazano jednak takiej korelacji. Być może owa korelacja nie występuje, może jest słabiej nasiloną, a być może ma ona miejsce w bardziej subtelnych częściach hipokampa (oznaczenia dotyczą całej struktury), jak np. w rejonie CA3, który wydaje się szczególnie narażony na bodźce stresowe. Szereg badań przedklinicznych czyni jednak wątpliwą kluczową tezę, że obniżenie poziomu BDNF w hipokampie jest warunkiem koniecznym do występowania działań niepożądanych. Co prawda można także wspomnieć, że odnotowano niewielką tendencję spadkową w ekspresji BDNF w hipokampie szczurów poddanych stresowi, nie jest ona istotna statystycznie.

4. Chroniczne podanie jonów magnezu, stres, układ glutaminianergiczny, BDNF

Wydaje się, że molekularny obraz procesu leczenia, czy też przywracanie prawidłowych zachowań w zwierzęcym modelu depresji, powinny polegać na odwracaniu zaburzeń na poziomie komórkowym przez substancję leczniczą. Taka sytuacja w przypadku chronicznego podania jonów magnezu w modelu chronicznego łagodnego stresu ma miejsce przy ekspresji podjednostki GluA1 receptora AMPA, podjednostki GuN1 receptora NMDA i BDNF w ciele migdałowatym. Podanie jonów magnezu zwierzętom stresowanym normalizuje podwyższony poziom tych białek. Równocześnie warto w tym miejscu nadmienić, że magnez także obniża poziom P-S831 i P-S845 podjednostki GluA1 receptora AMPA w ciele migdałowatym zwierząt stresowanych w stosunku do zwierząt stresowanych otrzymujących sól fizjologiczną. Jakkolwiek ów poziom nie różnił się istotnie w grupie stresowanej i grupie kontrolnej. Jeśli

aktywacja receptorów AMPA poprzez fosforylację jest kluczowym wstępnym warunkiem procesów synaptogenezy, które równocześnie wymagają aktywacji receptorów NMDA i uwolnienia BDNF, to jest prawdopodobne, że obniżenie poziomu fosforylacji receptora AMPA, poziomu BDNF, a także podjednostki GluN1 receptorów NMDA (Derkach i wsp. 2007; Lee i wsp. 2010; Lee i Kirkwood. 2011), obserwowane po chronicznym podaniu magnezu, redukuje szansę wystąpienia tych procesów. Zważywszy że hipertrofia i wzmożona aktywność ciała migdałowatego mogą być zaangażowane w ekspresję zaburzeń behawioralnych spowodowanych przez stres, jest prawdopodobne (McEwen. 2007; Lakshminarasimhan i Chattarji. 2012), że redukcja ekspresji wyżej wymienionych białek i fosforylacji S-831 i S845 może być jednym z istotniejszych przeciwdepresyjnych mechanizmów działania magnezu w chronicznym łagodnym stresie. Warto także dodać, że poziom BDNF po chronicznym podaniu magnezu istotnie wzrósł w hipokampie, co razem zdaje się sugerować aktywację neuronów hipokampa i osłabienie funkcji ciała migdałowatego. Być może zmiany te prowadzą do zahamowania nadmiernego rozrostu drzewka dendrytycznego ciała migdałowatego i zmniejszenia jego wpływu na hipokamp i oś HPA.

Analizując wyniki dotyczące ekspresji białek w ciele migdałowatym, warto także dodać, że chroniczne podanie jonów magnezu zwiększa ekspresję GAD-67 u zwierząt stresowanych w stosunku do zwierząt stresowanych otrzymujących sól fizjologiczną. Jest to o tyle istotne, że jak wynika z danych przedstawionych w literaturze przedmiotu, muscimol, który jest agonistą receptorów GABA-A, podany bezpośrednio do ciała migdałowatego zapobiega zaburzeniom LTP w hipokampie. Jeśli GAD-67 zwiększa poziom kwasu GABA, to należy także rozważyć wzrost ekspresji tego białka w ciele migdałowatym jako kolejny potencjalny mechanizm przeciwdepresyjny jonów magnezu (Kim i wsp. 2005). Równocześnie należy pamiętać, że GAD-67 jest białkiem, które przede wszystkim odpowiada za produkcję tzw. spoczynkowej puli GABA (Karolewicz i wsp. 2010a), dlatego też potrzebne są dalsze badania, by ustalić zależności pomiędzy stresem, GAD-67, ciałem migdałowatym i działaniem przeciwdepresyjnym.

Wspomniano wyżej, że podanie jonów magnezu u zwierząt narażonych na przewlekły stres powodowało podwyższenie poziomu BDNF w hipokampie. Jednocześnie badania skierowane na oznaczenie zmian w układzie receptorów AMPA wskazują na dosyć zaskakujące odkrycia. Po pierwsze, stres wzmacniał ekspresję podjednostki GluA1, po drugie, zaobserwowano znaczący spadek ekspresji tej podjednostki oraz obydwu badanych fosforylacji zarówno u zwierząt kontrolnych (bez istotności statystycznej) otrzymujących magnez, jak i u zwierząt stresowanych, po trzecie, magnez zwiększał ekspresję podjednostki GluA2 receptora AMPA. Wyniki te wydają się szczególnie zaskakujące, biorąc pod

uwagę pewne zależności pomiędzy receptorami AMPA, podjednostką GluA1, BDNF i przeciwdepresyjną aktywnością leków. Jakaś próbą wytłumaczenia powyższych zmian może być przyjęcie, że są to zmiany adaptacyjne, które powstały na skutek przewlekłej stymulacji receptorów AMPA. Nie można zapominać, że początek działania jonów magnezu zaobserwowano po trzecim tygodniu ich podawania. Tkanka została pobrana dwa tygodnie później. Nie można wykluczyć, że jeśli pobudzenie receptorów AMPA zapoczątkowuje cykl procesów prowadzących do synaptogenezy, to przy ciągłym pojawianiu się bodźca wzbudzającego (w tym wypadku jonów magnezu) w końcu dochodzi do aktywacji mechanizmów adaptacyjnych, które hamują nadmierne pobudzenie jakiegoś białka. Wydaje się, że z takim mechanizmem możemy mieć do czynienia w przypadku chronicznie podawanej ketaminy, która obniża poziom fosforylacji P-S845 podjednostki GluA1 (Maeng i wsp. 2008). Patrząc na to z innego punktu widzenia, można równie dobrze stwierdzić, że powyższe zmiany zachodzą także u zwierząt kontrolnych otrzymujących magnez, które w teście picia sacharozy nie różnią się od zwierząt kontrolujących otrzymujących sól fizjologiczną. Zatem same fosforylacje nie muszą mieć istotnego wpływu na zachowanie zwierząt.

Sądzymy jednak, że istnieje jeszcze jedna możliwość, którą warto rozpatrzyć w interpretacji powyższych wyników. Wiadomo na podstawie wcześniejszych badań, że jony litu także są skuteczne w znoszeniu behawioralnych zaburzeń w chronicznym nieprzewidywanym stresie. Co więcej, wiadomo także, że lit podawany razem z imipraminą znacznie skraca początek działania imipraminy w tym modelu (Sluzewska i Szczawinska. 1996). Równocześnie istnieją badania kliniczne, które pokazują, że wspólne podanie litu czy kwasu walproinowego z magnezem pozwala obniżyć stosowane dawki tych uznanych leków, co może sugerować, że mechanizmy tych trzech substancji w jakiś sposób na siebie zachodzą (Heiden i wsp. 1999). Wydaje się, że przeprowadzone badania i szereg badań Du i wsp. w jakiejś mierze potwierdzają powyższą tezę. Chroniczne podanie jonów litów u szczurów znacząco obniża poziom fosforylacji P-S845 w synaptosomach hipokampa. Odwrotnie działa imipramina, która indukuje wzrost P-S845. Prace Du i wsp. wskazują ponadto na bardzo ciekawą zależność pomiędzy P-S845 a potencjalnym przejściem z fazy depresyjnej do maniakalnej (Du i wsp. 2004a; Du i wsp. 2004b; Du i wsp. 2007; Du i wsp. 2008), wskazując na fakt, iż fosforylacja S845 może być jednym z istotnych mechanizmów tego wydarzenia. Równocześnie kwas walproinowy w badaniach na komórkach hipokampa obniża poziom ekspresji podjednostki GluA2. Odwrotnie działa na podjednostkę GluA2 receptora AMPA atypowy lek przeciwdepresyjny riluzol (Du i wsp. 2007). W świetle ustaleń badań grupy Du i wsp., prezentowanych tutaj badań oraz wcześniejszych badań prowadzonych z magnezem, które wskazują na jego przeciwną

aktywność (Poleszak i wsp. 2004; Poleszak. 2008), rysuje się pewien pośredni profil aktywności magnezu. Z jednej strony, widzimy jego aktywność w przedklinicznych testach lękowych, z drugiej, pokazujemy aktywność w chronicznym łagodnym stresie, w bulbektomii i możemy przeczytać o synergizmie z substancjami tymoleptycznymi. Jeśli zawężymy mechanizm działania magnezu tylko do układu receptorów AMPA i spróbujemy nakreślić jakąś zależność pomiędzy funkcjonowaniem tego układu a efektami behawioralnymi, to tutaj także wychodzi pewna „pośredniość”, którą oferuje chroniczne podawanie jonów magnezu. Z jednej strony, magnez zachowuje się podobnie do substancji tymoleptycznych w hipokampie, zmniejszając fosforylację podjednostki GluA1. Z drugiej jednak strony, zwiększa on ekspresję podjednostki GluA2 receptora AMPA, co jest charakterystyczne dla atypowego leku przeciwdepresyjnego riluzolu. Na dodatek u zwierząt stresowanych odnotowano wzrost ekspresji BDNF w hipokampie, co charakteryzuje leki przeciwdepresyjne (Nestler i wsp. 2002; Duman i Voleti. 2012; Duman i wsp. 2012). Oczywiście nie można powiedzieć, że powyższe efekty po prostu się sumują lub redukują. Jednoczesny wzrost ekspresji podjednostki GluA2 i obniżenie poziomu podjednostki GluA1 może sugerować zwiększenie znaczenia monomerycznych receptorów AMPA składających się z podjednostki GluA2, których rola w procesach przeciwdepresyjnego działania magnezu wymaga dalszych badań.

Jak dotąd, dyskutując nasze badania, nie wspomnieliśmy o wynikach uzyskanych w korze przedczołowej. Już na pierwszy rzut oka widać, że w PFC podanie magnezu znacząco obniża poziom ekspresji podjednostki GluA1 oraz obydwu badanych fosforylacji. Obserwowana sytuacja, podobnie jak w hipokampie, ma miejsce w tkankach pochodzących zarówno od zwierząt kontrolnych otrzymujących magnez, jak i od zwierząt stresowanych otrzymujących magnez. Jednocześnie nie odnotowano żadnych istotnych zmian w poziomie BDNF. Jeśli przyjąć, że w jakiejś mierze mechanizm działania przeciwdepresyjnego magnezu przypomina innych antagonistów receptora NMDA, to powyższe fakty są zastanawiające. Z drugiej jednak strony, pewne badania pokazują, że poziom BDNF w PFC (Fraga i wsp. 2013) po chronicznym podaniu ketaminy zależy od czasu, w którym pobierana jest tkanka. Przedstawia się to w ten sposób, że poziom BDNF rośnie, kiedy tkanka jest pobierana po godzinie od ostatniego podania leku, a spada po 6 godzinach od ostatniego podania (Fraga i wsp. 2013). Być może jednak znowu mamy do czynienia z aktywacją mechanizmów adaptacyjnych, które wyhamowują początkowy wzrost ekspresji czy fosforylacji badanych białek, bo należy ciągle pamiętać, że efekt przeciwdepresyjny magnezu występuje po trzech tygodniach jego podawania. Są to oczywiście tylko przypuszczenia i jednoznaczna odpowiedź na tym etapie badań jest trudna do sformułowania.

Bardzo ciekawym efektem obserwowanym u zwierząt stresowanych traktowanych magnezem jest wzrost poziomu podjednostki GluN2B receptora NMDA ze współtowarzyszącym temu podwyższonym poziomem białka gęstości synaptycznej PSD-95. Wiadomo, że tri-heteromeryczne receptory GluN1/GluN2A/GluN2B zlokalizowane w synapsie są odpowiedzialne za mobilizację białek gęstości synaptycznej, takich jak PSD-95 czy GKAP, które są niezbędne dla rozwoju owych połączeń synaptycznych (Paoletti i wsp. 2013). Omawiając oznaczenia biochemiczne w hipokampie, wskazaliśmy na powyższe białka jako na mechanizm prowadzący również do ekscytotoksyczności, jakkolwiek w układzie receptorów di-heteromerycznych GluN1/GluN2B zlokalizowanych pozasynaptycznie. Jednak w kontekście przeciwdepresyjnych efektów ujawnionych w teście picia sacharozy wydaje się, że powyższy wzrost może być oznaką także wzmożonej synaptogenezy i reorganizacji połączeń synaptycznych w korze przedczołowej. Warto dodać, że badania nad treoninianem magnezu, czyli preparatem magnezu o wysokiej biodostępności, pokazują wzrost gęstości podjednostki GluN2B u szczurów po 28 dniach jego chronicznego podawania. Ponadto ów wzrost jest skorelowany ze wzmożoną synaptogenezą i zwiększonym stężeniem BDNF w PFC (Slutsky i wsp. 2010). Jakkolwiek trzeba pamiętać, że paradygmaty postępowania zaproponowane w naszej pracy i w badaniach Slutsky i wsp. są zupełnie inne. Różnią się przede wszystkim rasą szczurów, dawkowaniem i sposobem dostarczenia magnezu do organizmu, czasem ekspozycji na jony magnezu, a także tym, że my obserwowaliśmy wzrost poziomu PSD-95 i GluN2B tylko u zwierząt poddanych stresowi. Efekty obserwowane przez Slutsky i wsp. dotyczyły szczurów, które nie były poddane żadnym bodźcom awersyjnym.

Szczególnie ważne jest to, że potencjał jonów magnezu do podwyższania poziomu podjednostki GluN2B w korze przedczołowej może mieć także znaczenie dla farmakoterapii depresji. Niektóre badania *post mortem* wskazują, że u ludzi chorych na depresję, którzy nie otrzymywali leków przeciwdepresyjnych, w grzbietowo-bocznej korze przedczołowej dochodzi do obniżenia ekspresji tej podjednostki i białka PSD-95, a zmiany te są redukowane przez leki przeciwdepresyjne (Feyissa i wsp. 2009).

Kolejna istotna obserwacja to wzrost poziomu ekspresji GAD-67 u zwierząt poddanych stresowi i jednocześnie otrzymujących magnez. Spadek w ekspresji GAD-67 w korze przedczołowej notowano także w badaniach *post mortem* u chorych na depresję (Karolewicz i wsp. 2010a). Również badania przedkliniczne prowadzone na myszach pokazują, że stres obniża poziom GAD-67 w PFC. Co ciekawe, w tych badaniach obniżony poziom GAD-67 korelował z przerostem drzewka dendrytycznego interneuronów w korze przedczołowej, co można tłumaczyć jako mechanizm ochronny neuronów piramidowych,

zapobiegający ich nadmiernemu pobudzeniu (Gilbert-Juan i wsp. 2012). Może to sugerować, że jony magnezu poprzez wzrost syntezy GAD-67 w jakiś sposób zwiększają udział transmisji GABA-ergicznej w PFC i w ten sposób chronią neurony korowe przed uszkodzającym działaniem nadmiernej stymulacji generowanej przez przewlekły stres.

Podsumowując opisane wyżej wyniki, wydaje się, że jeśli układ glutaminianergiczny w zastosowanym przez nas modelu do ewaluacji przeciwdepresyjnej aktywności magnezu ma rzeczywisty wpływ na generowanie zachowań depresyjnych, to efekt ten jest najsilniej zaznaczony w ciele migdałowatym poprzez wzrost biosyntezy podjednostki GluA1 receptora AMPA, GluN1 receptora NMDA i BDNF. Wszystkie powyższe zmiany są normalizowane przez podanie magnezu. Dodatkowo wydaje się, że podanie jonów magnezu może indukować efekt przeciwdepresyjny w innych strukturach mózgu, jak choćby przez wzrost poziomu BDNF w hipokampie. Niewykluczone jest także, że znaczenie terapeutyczne magnezu może polegać na podnoszeniu poziomu PSD-95 i podjednostki GluN2B w PFC oraz na nasileniu syntezy GAD-67 w ciele migdałowatym i PFC.

6.2 Dyskusja wyników – bulbektomia

1. Model bulbektomii a ludzka depresja

W modelu chronicznego łagodnego stresu określono potencjał magnezu do odwrócenia anhedonii mierzonej w teście picia sacharozy. Jednak jak wspomniano wcześniej, depresja jest diagnozowana na podstawie współwystępowania szeregu różnych innych objawów, których neurobiologiczne podłoże jest zróżnicowane (Stahl. 2008). Liczny odsetek chorych cierpi na depresję z pobudzeniem psychoruchowym i zaburzeniami lękowymi. Nadmierne pobudzenie psychoruchowe jest szczególnie niebezpiecznym objawem dla życia chorego, ponieważ stanowi istotny czynnik ryzyka wystąpienia próby samobójczej (Busch i wsp. 2003; Maj i wsp. 2003). Dlatego leki, które są skuteczne w redukowaniu pobudzenia psychoruchowego u chorych na depresję, są szczególnie cenne z terapeutycznego punktu widzenia. Obustronne usunięcie opuszek węchowych jest zwierzęcym modelem depresji agitowanej. Zwierzęta pozbawione opuszek węchowych w stresującym, nowym środowisku, jakie proponuje np. test wolnego pola, wykazują hiperaktywność (Kelly i wsp. 1997; Harkin i wsp. 2003; Song i Leonard. 2005). Ponadto model bulbektomii generuje szereg innych zmian behawioralnych między innymi obniżenie libido czy deficyty nabywania odruchu biernego unikania i interakcji socjalnych (Kelly i wsp. 1997; Harkin i wsp. 2003; Song i Leonard. 2005; Wang i wsp. 2007). Co ciekawe, wszystkie z wymienionych deficytów behawioralnych u zwierząt OB znajdują odzwierciedlenie w symptomach ludzkiej depresji (Stahl. 2008; Stahl. 2009). Zaburzenia behawioralne spowodowane usunięciem opuszek węchowych są redukowane przez leki przeciwdepresyjne oraz substancje o takim potencjale. Można w tym miejscu wymienić choćby amitryptylinę, fluoksetynę, dezipraminę czy cynk, jakkolwiek lista ta nie wyczerpuje wszystkich aktywnych leków w modelu bulbektomii (Nowak i wsp. 2003; Wang i wsp. 2007; MacHado i wsp. 2012).

2. Model bulbektomii – neurobiologiczne i neuroanatomiczne podłoże zaburzeń

Opuszki węchowe stanowią około 4% masy mózgu dorosłego szczura. Połączone są zarówno z wyższymi ośrodkami korowymi, jak i z układem limbicznym. Usunięcie opuszek węchowych powoduje anterogradowe, retrogradowe i transneuronalne neurodegeneracje. W rejonach mózgu czy to pośrednio, czy bezpośrednio unerwianych przez opuszki węchowe dochodzi do zmian w liczbie synaps, struktur drzewek dendrytycznych, odnerwień i innych podobnych zaburzeń (Van Riezen i Leonard. 1990; Kelly i wsp. 1997). Procesy neurodegeneracyjne dotyczą przede wszystkim takich struktur jak: ciało

migdałowate, hipokamp, kora przedczołowa, miejsce sinawe i jądro szwu mostu (Song i Leonard. 2005). Badania prowadzone z użyciem rezonansu magnetycznego wskazują również na różnice w intensywności sygnału pomiędzy szczurami Sham i OB w rejonach korowych, hipokampa i ciała migdałowatego (Wrynn i wsp. 2000). Tak szeroki zakres uszkodzeń w wymiarze anatomicznym jest także związany z licznymi dysfunkcjami w obrębie układów różnych neuroprzekaźników. Można wymienić niemal każdy ze znanych neuroprzekaźników i śmiało postawić hipotezę, że w jakimś regionie mózgu operacja bulbektomii doprowadzi albo do zaburzeń jego syntezy, albo do zmiany w ekspresji odpowiednich receptorów bądź transporterów zlokalizowanych w synapsie. Niemniej rozpatrując zaburzenia wywołane przez OB, wskazuje się przede wszystkim na układ noradrenergiczny i serotonergiczny jako główne układy uwikłane w ekspresję deficytów behawioralnych. Także leki, których aktywność przeciwdepresyjna wiąże się z tymi układami, są skuteczne w znoszeniu tych zaburzeń (Song i Leonard. 2005). Jeśli idzie o zaburzenia w funkcjonowaniu układu glutaminianergicznego, to jedna z pierwotnych hipotez próbujących wyjaśnić genezę behawioralnych efektów bulbektomii wskazywała na zaburzenie równowagi pomiędzy pobudzającymi i hamującymi neuroprzekaźnikami. Hipoteza ta została wsparta przez kilka istotnych prac badawczych, które między innymi wskazywały na podwyższone stężenie glicyny i obniżone stężenie glutaminy i asparaginy w mózgu szczurów OB (Harvey i wsp. 1975; Collins. 1984). Dodatkowo, liczne badania, które szczegółowo omówimy w dalszej części tej pracy, ukazują znaczące różnice w ekspresji białek receptorowych układu glutaminianergicznego (Nowak. 1996; Ho i wsp. 2001; Robichaud i wsp. 2001; Wang i wsp. 2007). Mając na uwadze powyższe przesłanki, postanowiliśmy ocenić potencjał magnezu do odwracania behawioralnych dysfunkcji w teście biernego unikania i wolnego pola w modelu bulbektomii. Podobnie jak w przypadku modelu chronicznego łagodnego stresu postanowiliśmy wyznaczyć dawkozależność dla trzech dawek jonów magnezu. Jako leku referencyjnego użyliśmy amitryptyliny.

3. Model bulbektomii – badania behawioralne

Chroniczne podawanie jonów magnezu w dawkach 15 i 20 mgMg/kg osłabiało deficyt w nabywaniu odruchu biernego unikania. Średnia liczba prób wymagana do nabycia odruchu biernego unikania była po podawaniu magnezu podobna do liczby wymaganych prób dla amitryptyliny. Jednocześnie podawanie jonów magnezu nie zmieniało w teście biernego unikania zachowania zwierząt kontrolnych. Osłabienie zdolności nabywania odruchu biernego unikania u szczurów OB jest dysfunkcją procesów pamięci i uczenia się (Leonard. 1984; Joly i Sanger. 1986; Lumia i wsp. 1992). Skuteczność magnezu w teście

biernego unikania zdaje się potwierdzać wcześniejsze doniesienia wskazujące na potencjał magnezu do usprawniania pamięci przestrzennej, asocjacyjnej zarówno u młodych, jak i starych szczurów (Slutsky i wsp. 2010).

W drugim z przeprowadzonych testów jony magnezu we wszystkich trzech zastosowanych dawkach obniżały hiperaktywność w teście wolnego pola mierzona liczbą ambulacji. Ponadto nie zaobserwowano żadnego wpływu magnezu na zachowanie zwierząt kontrolnych. Z racji tego, że wzmożona aktywność w teście wolnego pola jest interpretowana jako wzrost poziomu lęku w wyniku nagłego stresu, skuteczność magnezu w tym teście może wzmacniać dość dobrze ugruntowaną w badaniach przedklinicznych tezę o przeciwdepresyjno-anksjolitycznym profilu tego pierwiastka (Poleszak i wsp. 2004; Poleszak i wsp. 2004; Poleszak i wsp. 2005; Eby i Eby. 2006; Poleszak i wsp. 2008a; Abumaria i wsp. 2011; Serefko i wsp. 2013)

4. Model bulbektomii – oznaczenia biochemiczne

Badania dotyczące zależności pomiędzy leżą poszczególnych struktur mózgu a ich wpływem na zachowania pokazały, że hipokamp i ciało migdałowe mają decydujące znaczenie dla nabywania odruchu biernego unikania. Zniszczenie tych struktur prowadzi do utraty odruchu biernego unikania (Slotnick. 1973; Lorenzini i wsp. 1996; Ambrogio Lorenzini i wsp. 1997). Ponadto ciało migdałowe wspólnie z korą przedczołową mają fundamentalne znaczenie dla przetwarzania bodźców związanych ze strachem (LeDoux. 2000; Corcoran i Quirk. 2007). Powyższe ustalenia oraz fakty wskazujące na możliwe upośledzenie połączeń neuronalnych pomiędzy ciałem migdałowatym, korą przedczołową i hipokampem związane z możliwymi procesami neurodegeneracji jako następstwami bulbektomii pozwalają przypuszczać, że rozregulowanie w tych strukturach układu glutaminianergicznego i następstwa tego procesu mogą mieć poważny wpływ na zachowanie szczurów bulbektomizowanych w teście biernego unikania. Tezę tę wzmacniała przesłanka dotycząca znaczenia układu glutaminianergicznego dla procesów pamięci i uczenia się (Danysz i wsp. 1995; Day i wsp. 2003; Riedel i wsp. 2003). Dodatkowo na podstawie licznych opisanych badań wydaje się, że jony magnezu mogą także istotnie wpływać na wspomniane systemy.

W żadnej ze zbadanych struktur nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji badanych podjednostek receptorów NMDA, AMPA ani też BDNF pomiędzy grupą zwierząt Sham i OB. Wyniki dotyczące receptorów AMPA wydają się zgodne z dostępnymi w literaturze danymi, które pokazują, że

bulbektomia nie zmienia ekspresji podjednostki GluA1 AMPA (Webster i wsp. 2000). Wyniki badań dotyczących podjednostek receptora NMDA są podobne do tych, które uzyskali Wang i wsp., aczkolwiek ich badania dotyczyły grzbietowej części kory przedczołowej, poszczególnych części hipokampa (CA1-CA3 i zakręt zębaty) oraz wybranych części ciała migdałowatego (Wang i wsp. 2003). Brak zmian w ekspresji powyższych białek może sugerować, że rola receptorów układu glutaminianergicznego w ekspresji zaburzeń indukowanych przez OB jest ograniczona. Równocześnie nie można wykluczyć, że takie zmiany zachodzą, lecz dotyczą ściśle określonych obszarów badanych struktur.

Jakkolwiek nie odnotowano żadnych zmian w zakresie ekspresji białek receptorowych układu glutaminianergicznego u zwierząt OB, to chroniczne podawanie jonów magnezu prowadziło do istotnego statystycznie wzrostu białek podjednostki GluN2B i BDNF w ciele migdałowatym. To następstwo chronicznego podawania magnezu może mieć udział w jego działaniu przeciwdepresyjnym w modelu bulbektomii. Jak wcześniej wspomniano, ciało migdałowe jest kluczową strukturą dla ekspresji odruchu biernego unikania, choć nie ma bezpośrednich danych mówiących o zależności pomiędzy ekspresją czy nabywaniem odruchu biernego unikania a transmisją glutaminianergiczną. Jednocześnie liczne dane wskazują na udział transmisji glutaminianergicznej w ciele migdałowatym w związku z warunkowaniem strachu (Miserendino i wsp. 1990; Goosens i wsp. 2003). Tym samym mając na uwadze przesłanki, że OB prowadzi do degeneracji połączeń ciała migdałowatego z innymi strukturami mózgu, że glutaminian i BDNF są zaangażowane w procesy neurogenezy, które, jak dzisiaj się sądzi, są głównym mechanizmem działania leków przeciwdepresyjnych, jest możliwe, że nadmierny wzrost ekspresji BDNF i GluN2B prowadzi do odpowiedniej reorganizacji połączeń synaptycznych w ciele migdałowatym, co skutkuje tym, że szczury OB otrzymujące magnez lepiej wypadają w teście biernego unikania (Kelly i wsp. 1997; Skolnick i wsp. 2009; Li i wsp. 2010). Być może jest to odpowiedź organizmu, polegająca na tym, że wzrost poziomów BDNF i podjednostki GluN2B i ich potencjalne fizjologiczne następstwa regulują funkcjonowanie neuronów ciała migdałowatego, których funkcjonalność jest zaburzona na innym poziomie, np. na poziomie odmiennych układów neuroprzekazników (Song i Leonard. 2005).

Podobnych następstw podawania jonów magnezu nie dopatrzone się w korze przedczołowej oraz w hipokampie. Powyższe ustalenia nie znalazły potwierdzenia w badaniach poziomu ekspresji mRNA. Jak się okazało, podawanie magnezu w bardzo znaczący sposób zwiększało ekspresję mRNA dla podjednostki GluN2B w hipokampie i korze przedczołowej zarówno u zwierząt Sham, jak i szczurów OB. Brak podobieństwa wzorców ekspresji na poziomie białkowym i mRNA może być tłumaczony co najmniej na

kilka sposobów. Po pierwsze, zastosowane metody różnią się od siebie czułością detekcji. Po drugie, nie można wykluczyć licznych modyfikacji postranslacyjnych i postranskrypcyjnych czy różnych czasów półtrwania dla mRNA i białka. Warto także wspomnieć, że w modelu chronicznego łagodnego stresu po podawaniu jonów magnezu uzyskano wzrost poziomu podjednostki GluN2B w korze przedczołowej zwierząt stresowanych. Jednak ów wzrost odnotowano po pięciu tygodniach podawania. Także 28 dni doustnych podań treoninianu magnezu skutkowało wzmożoną ekspresją podjednostki GluN2B (Abumaria i wsp. 2011). Być może zatem dwa tygodnie to zbyt krótki okres, by odnotować wzmożoną ekspresję białka podjednostki GluN2B.

Wcześniej opisano wzrost poziomu BDNF w ciele migdałowatym zwierząt OB otrzymujących magnez. Podobny efekt obserwuje się u tych zwierząt w hipokampie i korze przedczołowej. Wydaje się jednak, że powyższy wzrost poziomu BDNF obserwowany po magnezie nie wynika bezpośrednio z odwracania patologicznych następstw usunięcia opuszek węchowych, ponieważ w żadnej z przebadanych struktur mózgu szczurów OB nie stwierdzono obniżonego poziomu BDNF w stosunku do zwierząt Sham. Wyniki tych badań są w zgodne z danymi w literaturze przedmiotu, które wskazują na brak istotnej korelacji pomiędzy usunięciem opuszek węchowych a ekspresją białka BDNF u szczurów (Luo i wsp. 2010). Warto dodać, pamiętając o wszelkich zastrzeżeniach wspomnianych wyżej, że bulbektomia u szczurów nie zmienia także poziomu mRNA dla BDNF (Van Hoomissen i wsp. 2003).

Omawiając

mechanizm przeciwdepresyjny ketaminy, wskazano na etap aktywacji receptorów AMPA jako na warunek konieczny wystąpienia efektów przeciwdepresyjnych (Li i wsp. 2010). Także klasyczne leki przeciwdepresyjne aktywują receptory AMPA poprzez ich fosforylację, która umożliwia wbudowanie podjednostki GluA1 do synapsy (Svenningsson i wsp. 2002; Svenningsson i wsp. 2007). Ponadto wspólnym dla ketaminy i klasycznych leków przeciwdepresyjnych etapem jest wzmożona biosynteza BDNF i aktywacja procesów neuroplastyczności (Skolnick. 1999; Li i wsp. 2010). Analizując wyniki z kory przedczołowej szczurów OB, można stwierdzić wzmożone fosforylacje S831, S845 podjednostki GluA1 receptora AMPA, a także wzrost poziomu BDNF. Jak wcześniej nadmieniono, modyfikacje te są odpowiedzialne za przesunięcie puli receptorów AMPA do przestrzeni synaptycznej, co jest równoznaczne ze zwiększeniem udziału tych receptorów w transmisji glutaminianergicznej. Równocześnie warto odnotować, że ogólny poziom podjednostki GluA1 nie ulega zmianie, co może oznaczać, że w tym wypadku obserwowana jest nie produkcja nowego białka GluA1, lecz redystrybucja tego, które jest w

komórce dostępne. Zwiększony stopień fosforylacji podjednostki GluA1 sugeruje aktywację wewnątrzkomórkowych kinaz, typu PKA i PKC i CaMkII, aktywacja która jest zależna od podwyższonego poziomu wapnia wewnątrz komórki (Lee i wsp. 2010; Lee i Kirkwood. 2011). Z jednej strony, owe wzmożone fosforylacje mogą być następstwem wzmożonej transmisji glutaminianergicznej, która zwiększa poziom jonów wapnia we wnętrzu komórki. Z drugiej jednak strony, nie można wykluczyć, że chroniczne podawanie jonów magnezu szczurom OB pierwotnie aktywuje ścieżkę wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału związaną z czynnikiem transkrypcyjnym CREB, co także może prowadzić do aktywacji CaMkII, PKC, PKA, i fosforylacji podjednostki GluA1 (Nestler i wsp. 1989; Meyer i Habener. 1993; Abumaria i wsp. 2011). W kontekście tych przypuszczeń warto wspomnieć, że we wcześniejszych pracach wykazano potencjał chronicznie podawanych jonów magnezu do fosforylacji CREB u szczurów oraz potencjał magnezu jako antagonisty NMDA do hamowania represora genu kodującego CREB (Abumaria i wsp. 2011; Miyashita i wsp. 2012). Chociaż na tym etapie badań nie można jednoznacznie pokazać ścieżek transdukcji sygnału, poprzez które chronicznie podawany magnez zwiększa poziom BDNF i ufosforylowania podjednostki GluA1, to biorąc pod uwagę znaczenie BDNF i aktywacji receptorów AMPA dla przeciwdepresyjnego działania leków, jest prawdopodobne, że powyższe wydarzenia mają istotny wkład w przeciwdepresyjny mechanizm działania magnezu w modelu bulbektomii.

O ile w korze przedczołowej podawanie magnezu u zwierząt bulbektomizowanych zwiększało ekspresję BDNF i aktywację receptorów AMPA, o tyle w hipokampie obserwowana sytuacja jest odmienna. Co prawda podawanie magnezu zwierzętom OB podobnie jak w korze przedczołowej zwiększa w hipokampie poziom BDNF w stosunku do zwierząt OB otrzymujących sól, ale równocześnie u zwierząt OB traktowanych solą fizjologiczną odnotowano wzrost P-S845 w stosunku do zwierząt NaCl Sham. Co ciekawe, podwyższony poziom P-S845 był normalizowany przez magnez. Rozpatrywana z punktu widzenia transmisji glutaminianergicznej w hipokampie, P-S845 jest odpowiedzialna za transport podjednostki GluA1 do przestrzeni okołosynaptycznej, która jest rezerwuarem receptorów AMPA (Lee i wsp. 2010; Lee i Kirkwood. 2011). Nie jest znany na obecną chwilę następny krok warunkujący przejście z przestrzeni okołosynaptycznej do synapsy. Tym samym nie można wykluczyć, że u zwierząt OB dochodzi do potencjalizacji transmisji glutaminianergicznej przez receptory AMPA. Jednakże nawet jeśli jest to prawda, to powyższym zdarzeniom nie towarzyszy zwiększona ekspresja BDNF, co ma miejsce po podaniu magnezu. Przy omawianiu wyników chronicznego łagodnego stresu wspomniano o możliwej roli P-S845 podjednostki GluA1 w generowaniu zmiany faz z depresyjnej na maniakalną w chorobie dwubiegunowej.

Pokazano także, że leki o działaniu tymoleptycznym, jak lit czy kwas walproinowy, obniżają fosforylację S845 w synaptosomach CA1 hipokampa, obniżając jednocześnie stosunek udziału receptorów AMPA/NDMA w transmisji glutaminianergicznej (Du i wsp. 2007; Du i wsp. 2008). W tym kontekście cenną informacją jest także fakt, iż wzmożona P-S845 w zakręcie zębatym hipokampa jest istotnym elementem w indukowaniu hiperaktywności zależnej od amfetaminy, która jest hamowana po podaniu czynnika hamującego fosforylację (Du i wsp. 2008). W związku z powyższymi twierdzeniami nasuwa się kilka pytań. Po pierwsze, na ile wzrost P-S845 podjednostki GluA1 jest charakterystyczny dla całej populacji neuronów hipokampa szczurów OB, a na ile jest to zjawisko charakterystyczne dla wybranego regionu tej struktury? Jest to o tyle istotna kwestia, że zwiększona ekspresja BDNF, obserwowana w naszych badaniach, niekoniecznie musi dotyczyć tych samych regionów hipokampa, w których znaleziono podwyższony poziom P-S845. Taka interpretacja ma również uzasadnienie w kontekście omawianych wcześniej wyników dotyczących chronicznego łagodnego stresu, gdzie odnotowano wzrost ekspresji BDNF przy spadku ekspresji i fosforylacji podjednostki GluA1 receptora AMPA. Po drugie, wyniki badań nad molekularnym podłożem aktywności magnezu w chronicznym łagodnym stresie oraz OB, a także dane płynące z literatury przedmiotu, sugerują podobieństwo pomiędzy mechanizmami działania litu i magnezu. Być może rzeczywiście obydwa jony w pewnej mierze wywołują podobne efekty na podjednostki receptorów AMPA. Jednakże nie można w przesadny sposób zestawiać przeciwdepresyjnej aktywności jonów magnezu z działaniem jonów litu. Tezę tę wzmacniają chociażby badania, w których wykazano, że jony litu chronicznie podawane nie są w stanie odwrócić wywołanej przez usunięcie opuszek węchowych hiperaktywności w teście wolnego pola (Song i Leonard. 1994). W związku z tym muszą istnieć także istotne różnice w molekularnych mechanizmach działania obydwu jonów.

Następnym istotnym aspektem tej pracy jest rola transmisji GABA-ergicznej w modelu bulbektomii. Jednym z kluczowych punktów w biosyntezie GABA jest przekształcenie glutaminianu w GABA za pomocą reakcji enzymatycznej katalizowanej przez białka GAD-67 i GAD-65. Jest to szczególnie istotne w kontekście obecnych rozważań nad przeciwdepresyjną aktywnością magnezu, ponieważ obniżony poziom GAD-67 w grzbietowo-bocznej korze przedczołowej jest, jak już wspomniano, skorelowany z występowaniem depresji u ludzi (Karolewicz i wsp. 2010b). Badania dotyczące gęstości receptorów GABA w modelu bulbektomii pokazują obniżony poziom gęstości receptorów GABA-B w korze czołowej i podwyższony poziom receptorów GABA-A w hipokampie (Dennis i wsp. 1993). Dodatkowo chroniczne podawanie szczurom OB dezipraminy leku o przeciwdepresyjnej aktywności zwiększa gęstość receptorów

GABA-B w korze czołowej. Dane te mogą wskazywać, że zwiększony udział transmisji GABA-ergicznej w korze czołowej może wpływać na procesy odwracania behawioralnych zmian wywołanych przez bulbektomię. Służebna rola aktywacji układu GABA-ergicznego w modelu bulbektomii wydaje się jeszcze wyraźniej podkreślona w badaniach pokazujących aktywność w tym modelu takich leków jak baklofen czy progabid, które są związkami z bardzo silnie zaznaczoną komponentą GABA-mimetyczną (Lloyd i wsp. 1983; Kelly i wsp. 1997). W omawianych badaniach zaobserwowano znaczące obniżenie poziomu GAD-67 w korze przedczołowej szczurów bulbektomizowanych. Sugeruje to znaczne obniżenie biosyntezy GABA, ponieważ GAD-67 jest białkiem odpowiedzialnym za syntezę około 90% całej puli tego związku. Ważna różnica pomiędzy GAD-67 a izoformą GAD-65 polega na tym, że białko GAD-65 syntetyzuje GABA przede wszystkim w sytuacji podwyższonej aktywności neuronów GABA-ergicznych, GAD-67 jest z kolei odpowiedzialne za biosyntezę GABA zużywanego w spoczynkowej aktywności neuronów GABA-ergicznych. Jeśli tak, to należy się spodziewać, że przede wszystkim spoczynkowa aktywność neuronów GABA-ergicznych w korze przedczołowej szczurów OB będzie upośledzona (Patel i wsp. 2006). Zestawiając te ustalenia z danymi dotyczącymi obniżonej gęstości receptorów GABA-B u zwierząt bulbektomizowanych oraz ze skutecznością w modelu bulbektomii takich leków jak baklofen czy progabid, można interpretować powyższe wyniki jako wskazujące na znaczące upośledzenie transmisji GABA-ergicznej w korze przedczołowej szczurów poddanych bulbektomii. Osobną kwestią, wymagającą dalszych i głębszych badań, jest to, czy spadek biosyntezy GAD-67 jest efektem np. bezpośredniej dysfunkcji korowych interneuronów GABA, czy też może osłabienie funkcjonowania układu GABA-ergicznego to konsekwencja aktywacji mechanizmów adaptacyjnych, które „celowo” osłabiają funkcjonowanie układu GABA-ergicznego.

W literaturze pojawiło się w ostatnich latach szereg danych wskazujących, że zarówno stres oksydacyjny, jak i procesy zapalne w centralnym systemie nerwowym mogą przyczyniać się do osłabienia funkcji poznawczych i procesów neurodegeneracyjnych obserwowanych w wielu chorobach psychicznych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy depresja (Scapagnini i wsp. 2012). Z drugiej strony, wiadomo również, że jednym z czynników indukujących mechanizmy oksydacyjne jest nadmierna aktywacja receptorów glutaminianergicznych NMDA, która jest także jednym z mechanizmów zaangażowanych w patogenezę depresji.

Biorąc pod uwagę przedstawione we wstępie dane dotyczące roli metalotionein w funkcjonowaniu centralnego systemu nerwowego oraz zmian w poziomie tych białek w przebiegu chorób

neurodegeneracyjnych, za cel tej pracy przyjęto określenie, czy zmiany w poziomach MT towarzyszą również depresji oraz czy zmiany te są odwracane przez leki przeciwdepresyjne i jony magnezu.

Poziom MT-1, MT-2 i MT-3 oznaczono w korze oraz hipokampie szczurów poddanych procedurze usunięcia opuszek węchowych (OB), zwierząt kontrolnych (Sham) oraz u zwierząt, u których zastosowano chroniczne podania amitryptyliny i jonów magnezu. Usunięcie opuszek węchowych powodowało znaczne podwyższenie poziomu wszystkich badanych MT w korze przedczołowej szczurów. Pamiętając, że usunięcie opuszek węchowych indukuje zmiany neurodegeneracyjne w rejonach mózgu pośrednio lub bezpośrednio unerwianych przez opuszki węchowe, takich jak: ciało migdałowe, hipokamp, kora przedczołowa czy miejsce sinawe (Wrynn i wsp. 2000; Song i Leonard. 2005), oraz że MT-1/2 mają właściwości neuroprotektoryjne (Santos i wsp. 2012), należy stwierdzić, iż zaobserwowany wzrost poziomu tych MT u szczurów bulbektomizowanych potwierdza ich neuroprotektoryjne działanie i ich rolę w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych, w tym depresji. Wzrost poziomu badanych MT w PFC, ale nie hipokampie szczurów może być związany z ekspresją samych MT (Santos i wsp. 2012). Jak wspomniano we wstępie, MT, a zwłaszcza MT-1/2, występują głównie w korze, jedynie MT-3 występuje zarówno w korze, jak i hipokampie.

Druga istotna obserwacja wynikająca z otrzymanych wyników to fakt, że zmiany w poziomie MT są odwracane przez lek przeciwdepresyjny, w tym wypadku amitryptylinę, co może być skorelowane ze skutecznym przeciwdepresyjnym działaniem amitryptyliny w tym modelu i normalizacją przez ten lek symptomów depresji obserwowanych zarówno w teście wolnego pola, jak i teście biernego unikania. Podawanie jonów magnezu zmniejszyło jedynie poziom MT-1 i MT-2 w PFC i hipokampie szczurów bulbektomizowanych, nie wpłynęło natomiast na poziom MT-3 w PFC, ale obniżyło znacząco poziom MT-3 w hipokampie. Z drugiej strony, jony magnezu zmniejszyły równocześnie poziom MT-2 i MT-3 u zwierząt kontrolnych w hipokampie, co sugeruje istnienie dodatkowego mechanizmu regulacji tych MT przez magnez oprócz znoszenia objawów depresji. Jak wspomniano wyżej, nadmierna aktywacja receptorów NMDA prowadzi do oksydacyjnego uszkodzenia neuronów (Yu i wsp. 2011). Inne badania pokazały, że ekscytotoksyczność związana z nadaktywacją receptora NMDA znacząco zwiększa poziom MT-1/2 w hodowli komórek neuronalnych kory (Chung i wsp. 2004) co zostało później potwierdzone w badaniach *in vivo*, gdzie stwierdzono, że ekspozycja na kwas NMDA prowadzi do wzrostu poziomu MT-1/2 w korze myszy (Yu i wsp. 2011). Badania na myszach transgenicznym pokazały, że istnieje określony poziom MT w mózgu, który chroni komórki przed oksydacyjnym uszkodzeniem wynikającym z nadmiernej aktywacji

receptorów NMDA (Yu i wsp. 2011). Obniżony poziom MT-2 w hipokampie po podaniu jonów magnezu może sugerować, że hamowanie funkcji receptora NMDA przez jony magnezu może w sposób pośredni regulować również poziom MT lub zastępować ich funkcję. Są to jedynie przypuszczenia i taka hipoteza wymaga weryfikacji. MT-3 różni się dość znacznie od MT-1/2 i jej rola związana jest ściśle z homeostazą cynku w mózgu, co potwierdzałoby brak zmian w poziomie tej metalotioneiny w PFC. Otrzymane wyniki sugerują, że to raczej MT-1 i MT-2, a nie MT-3, mogą być zaangażowane w mechanizmy związane z przeciwdepresyjnym działaniem jonów magnezu.

Rozdział 7

Zakończenie

7.1 Podsumowanie

1. W przeprowadzonych badaniach wykazano aktywność przeciwdepresyjną magnezu (wodoroasparaginianu magnezu) w modelu chronicznego łagodnego stresu (test picia sacharozy) a w modelu bulbektomii – usunięcia opuszek węchowych (test wolnego pola i test biernego unikania) u szczurów. Magnez w dawce 15mgMg/kg masy ciała odwracał wywołaną stresem redukcję picia sacharozy (już w trzecim tygodniu stosowania) w modelu chronicznego łagodnego stresu. Natomiast, w modelu bulbektomii wykazano aktywność magnezu w dawkach 10, 15 i 20 mgMg/kg w teście wolnego pola oraz 15 i 20 mgMg/kg w teście biernego unikania. Do badań biochemicznych wybrano dawkę 15 mgMg/kg.
2. Chroniczny łagodny stres zwiększał ekspresję BDNF, podjednostki GluA1 receptora AMPA i podjednostki GluN1 receptora NMDA w ciele migdałowatym, a chronicznie stosowany magnez normalizował te zmiany. Ponadto, chroniczne stosowanie magnezu u zwierząt poddawanych chronicznemu łagodnemu stresowi zwiększało ekspresję białek PSD-95, GluN2B i GAD-67 w korze przedczołowej i BDNF w hipokampie w stosunku do zwierząt stresowanych otrzymujących sól fizjologiczną.
3. Operacja usunięcia opuszek węchowych wywołała spadek ekspresji GAD-67 w korze przedczołowej oraz wzrost P-S845 w hipokampie. Poziom obydwu protein był normalizowany przez chroniczne stosowanie magnezu. Ponadto, chroniczne stosowanie magnezu szczurom OB skutkowało wzmożonym ufosforylowaniem S-831 i S-845 podjednostki GluA1 oraz zwiększonym poziomem ekspresji BDNF w korze przedczołowej. Zwiększoną ekspresję BDNF indukowaną przez magnez odnotowano także w ciele migdałowatym i hipokampie szczurów OB. W ciele migdałowatym wykazano także wzmożoną ekspresję podjednostki GluN2B.
4. Usunięcie opuszek węchowych zwiększało transkrypcję mRNA dla Metalotionein 1, 2 i 3 w korze przedczołowej, a efekt dla MT 2 był normalizowany przez chroniczne stosowanie magnezu.

7.2 Wnioski

1. Magnez wykazuje aktywność przeciwdepresyjną w dwóch eksperymentalnych modelach depresji (chroniczny łagodny stres i bulbektomia) co jest kolejnym ważnym argumentem potwierdzającym potencjalną aktywność jonów magnezu w klinicznej depresji.
2. Chroniczne podawanie jonów magnezu zwierzętom stresowanym obniżyło podwyższony przez stres poziom BDNF, podjednostki GluN1 receptora NMDA oraz podjednostki GluA1 receptora AMPA w ciele migdałowatym. Ponadto u zwierząt stresowanych otrzymujących magnez wykazano wzrost ekspresji BDNF w hipokampie w stosunku do zwierząt stresowanych otrzymujących sól fizjologiczną.
3. Chroniczne podawanie jonów magnezu w modelu bulbektomii zwiększa poziom fosforylacji S-831 i S-845 podjednostki GluA1 receptora AMPA w korze przedczołowej szczurów OB. Aktywacji receptorów AMPA w PFC towarzyszy wzrost ekspresji BDNF. Zwiększony poziom BDNF odnotowano także w hipokampie i ciele migdałowatym zwierząt OB otrzymujących magnez. Zwiększonej ekspresji BDNF w ciele migdałowatym towarzyszył zwiększony poziom podjednostki GluN2B receptora NMDA.
4. Wyniki badań wskazują na zaangażowanie szlaku transmisji NMDA/AMPA/BDNF w aktywności przeciwdepresyjnej magnezu.

7.3 Streszczenie

Głównym celem pracy było określenie przeciwdepresyjnego potencjału magnezu w modelu chronicznego łagodnego stresu oraz w modelu bulbektomii (usunięcia opuszek węchowych).

Badania przeprowadzono na samcach szczurów rasy Wistar (chroniczny łagodny stres) i samcach szczurów rasy Sprague-dawley (bulbektomia). Przeciwdepresyjną aktywność jonów magnezu w modelu chronicznego łagodnego stresu badano za pomocą skuteczności w teście picia sacharozy, natomiast przeciwdepresyjną aktywność jonów magnezu w modelu bulbektomii określano w testach biernego unikania i wolnego pola. W badaniach biochemicznych, których celem było określenie wpływu poszczególnych procedur i jonów magnezu na elementy układu glutaminianergicznego wykorzystano odpowiednio: metodę western blotting do oznaczania ekspresji białek i metodę RT-PCR do oznaczania poziomu mRNA.

W przeprowadzonych badaniach wykazano aktywność przeciwdepresyjną magnezu (wodorooasparaginianu magnezu) w modelu chronicznego łagodnego stresu (test picia sacharozy) i w modelu bulbektomii (test wolnego pola i test biernego unikania) u szczurów. Magnez w dawce 15mgMg/kg masy ciała odwracał wywołaną stresem redukcję picia sacharozy (już w trzecim tygodniu stosowania) w modelu chronicznego łagodnego stresu. Natomiast, w modelu bulbektomii wykazano aktywność magnezu w dawkach 10, 15 i 20 mgMg/kg w teście wolnego pola oraz 15 i 20 mgMg/kg w teście biernego unikania. Do badań biochemicznych wybrano dawkę 15 mgMg/kg.

Chroniczny łagodny stres zwiększał ekspresję BDNF, podjednostki GluA1 receptora AMPA i podjednostki GluN1 receptora NMDA w ciele migdałowatym, a chronicznie stosowany magnez normalizował te zmiany. Ponadto, chroniczne stosowanie magnezu u zwierząt poddawanych chronicznemu łagodnemu stresowi zwiększało ekspresję białek PSD-95, GluN2B i GAD-67 w korze przedczołowej i BDNF w hipokampie w stosunku do zwierząt stresowanych otrzymujących sól fizjologiczną.

Operacja usunięcia opuszek węchowych wywołała spadek ekspresji GAD-67 w korze przedczołowej oraz wzrost P-S845 w hipokampie. Poziom obydwu protein był normalizowany przez chroniczne stosowanie magnezu. Ponadto, chroniczne stosowanie magnezu u szczurów OB skutkowało wzmożonym ufosforylowaniem S-831 i S-845 podjednostki GluA1 oraz zwiększonym poziomem ekspresji BDNF w korze przedczołowej. Zwiększoną ekspresję BDNF indukowaną przez magnez odnotowano także

w ciele migdałowatym i hipokampie szczurów OB. W ciele migdałowatym wykazano także wzmożoną ekspresję podjednostki GluN2B. Usunięcie opuszek węchowych zwiększyło transkrypcję mRNA dla metalotionein 1, 2 i 3 w korze przedczołowej, a efekt dla MT-2 został znormalizowany przez chroniczne stosowanie magnezu.

Wyniki badań prezentowanych w tej rozprawie dostarczają dalszych przed-klinicznych dowodów na przeciwdepresyjną aktywność magnezu w dwóch eksperymentalnych modelach depresji, co jest kolejnym ważnym argumentem potwierdzającym potencjalną aktywność jonów magnezu w klinicznej depresji. Ponadto badania biochemiczne wskazują na zaangażowanie szlaku transmisji NMDA/AMPA/BDNF w aktywność przeciwdepresyjną magnezu.

7.4 Abstract

The determination of antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild stress and olfactory bulbectomy-the animal models of depression was the main objective of these studies.

Studies were conducted on Wistar male rats (chronic mild stress) and Sprague-Dawley male rats (olfactory bulbectomy). The antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild stress model was measured in the sucrose solution intake test. For evaluation of antidepressant-like activity of magnesium in the olfactory bulbectomy model the passive avoidance and open field tests were used. The expression of chosen proteins and mRNA of molecules' engaged in the functioning of glutamate system were determined respectively by western blotting and RT-PCR methods.

Magnesium at a dose of 15mgMg/kg reversed reduction in the sucrose solution intake evoke by chronic mild stress after 3 weeks of treatment. Administration of magnesium at doses of 15 and 20 mgMg/kg significantly improved ability to acquisition of passive avoidance reflex in OB rats. In the open field test all used doses (10, 15 i 20 mgMg/kg) of magnesium reduced hyperactivity induced by bulbectomy.

After chronic mild stress increased levels of GluN1 subunit of NMDA receptors and GluA1 subunit of AMPA receptors in amygdala were observed. These changes were accompanied by elevated level of BDNF. All of these alterations were reversed by chronic magnesium treatment. Furthermore, magnesium administration in stressed rats led to the increase level of GluN2B subunit of NMDA receptor and PSD-95, compare to control stress animals.

Removal of olfactory bulbs induced a decreased level of GAD-67 in PFC and reduced level of P-S845 of GluA1 subunit of AMPA receptors in the hippocampus. Chronic administration of magnesium at a dose of 15mgMg/kg reversed these changes. Two weeks of magnesium treatment in OB rats led to enhanced P-S831 and P-S845 of GluA1 subunit of AMPA receptors in PFC, compare to OB rats treated by NaCl. Concomitantly the BDNF level in PFC after magnesium treatment was also increased compare to OB NaCl rats. The enhanced expression of BDNF after magnesium treatment in OB rats was also noticed in amygdala and hippocampus. In amygdala of OB rats chronically treated with magnesium also elevated level of GluN2B subunit of NMDA receptors was found. In PFC of OB animals decreased levels of mRNA of MT 1, 2 and 3 were observed. Chronic magnesium treatment normalized level of mRNA of MT 1 and MT 2.

The results obtained in this PhD thesis provide further, preclinical evidence for the antidepressant-like activity of magnesium. Antidepressant-like activity of magnesium showed in two animal model of depression is very important argument for potential utility of magnesium in treatment of clinical depression. Additionally, biochemical assays let argue that the antidepressant-like activity of magnesium may involve NMDA/AMPA/BDNF pathways.

7.5 Piśmiennictwo

1. Aan Het Rot M, Zarate Jr. CA, Charney DS, Mathew SJ (2012) Ketamine for depression: Where do we go from here? *Biol Psychiatry* 72:537-547.
2. Abumaria N, Yin B, Zhang L, Li X-, Chen T, Descalzi G, Zhao L, Ahn M, Luo L, Ran C, Zhuo M, Liu G (2011) Effects of elevation of brain magnesium on fear conditioning, fear extinction, and synaptic plasticity in the infralimbic prefrontal cortex and lateral amygdala. *Journal of Neuroscience* 31:14871-14881.
3. Ambrogio Lorenzini ,C.G., Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G (1997) Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response memory trace. *Brain Res* 768:242-248.
4. Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng P-, Kavalali ET, Monteggia LM (2011) NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475:91-96.
5. Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, Skutkova H, Provaznik I, Hubalek J, Kizek R (2012) Mammalian metallothioneins: Properties and functions. *Metallomics* 4:739-750.
6. Begon S, Pickering G, Eschaliere A, Mazur A, Rayssiguier Y, Dubray C (2001) Role of spinal NMDA receptors, protein kinase C and nitric oxide synthase in the hyperalgesia induced by magnesium deficiency in rats. *Br J Pharmacol* 134:1227-1236.
7. Berman RM, Cappiello A, Anil A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47:351-354.
8. Blumberg SH, Izard CE (1986) Discriminating Patterns of Emotions in 10- and 11-Year-Old Children's Anxiety and Depression. *J Pers Soc Psychol* 51:852-857.
9. Boyce-Rustay JM, Holmes A (2006) Genetic inactivation of the NMDA receptor NR2A subunit has anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice. *Neuropsychopharmacology* 31:2405-2414.
10. Burgdorf J, Zhang X-, Nicholson KL, Balster RL, David Leander J, Stanton PK, Gross AL, Kroes RA, Moskal JR (2013) GLYX-13, a NMDA receptor glycine-site functional partial agonist, induces antidepressant-like effects without ketamine-like side effects. *Neuropsychopharmacology* 38:729-742.
11. Burgdorf J, Zhang X-, Weiss C, Matthews E, Disterhoft JF, Stanton PK, Moskal JR (2011) The N-methyl-D-aspartate receptor modulator GLYX-13 enhances learning and memory, in young adult and learning impaired aging rats. *Neurobiol Aging* 32:698-706.
12. Busch KA, Fawcett J, Jacobs DG (2003) Clinical correlates of inpatient suicide. *J Clin Psychiatry* 64:14-19.
13. Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM (2004) Lower Hippocampal Volume in Patients Suffering from depression: A Meta-Analysis. *Am J Psychiatry* 161:598-607.
14. Castro JE, Varea E, Márquez C, Cordero MI, Poirier G, Sandi C (2010) Role of the amygdala in antidepressant effects on hippocampal cell proliferation and survival and on depression-like behavior in the rat. *PLoS ONE* 5.
15. Charney DS (1998) Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry* 59:11-14.

16. Chung RS, Adlard PA, Dittmann J, Vickers JC, Chuah MI, West AK (2004) Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. *J Neurochem* 88:454-461. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.02193.x.
17. Collins GGS (1984) Amino acid transmitter candidates in various regions of the primary olfactory cortex following bulbectomy. *Brain Res* 296:145-147.
18. Corcoran KA, Quirk GJ (2007) Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *Journal of Neuroscience* 27:840-844.
19. Cuijpers P, Smit F, Oostenbrink J, De Graaf R, Ten Have M, Beekman A (2007) Economic costs of minor depression: A population-based study. *Acta Psychiatr Sci* 115:229-236.
20. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.
21. Danysz W, Zajackowski W, Parsons CG (1995) Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav Pharmacol* 6:455-474.
22. Day M, Langston R, Morris RGM (2003) Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. *Nature* 424:205-209.
23. Decollogne S, Tomas A, Lecerf C, Adamowicz E, Seman M (1997) NMDA receptor complex blockade by oral administration of magnesium: Comparison with MK-801. *Pharmacology Biochemistry i Behavior* 58:261-268.
24. Dennis T, Beauchemin V, Lavoie N (1993) Differential effects of olfactory bulbectomy on GABAA and GABAB receptors in the rat brain. *Pharmacology, Biochemistry i Behavior* 46:77-82.
25. Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 8:101-113.
26. Diazgranados N, Ibrahim L, Brutsche NE, Newberg A, Kronstein P, Khalife S, Kammerer WA, Quezado Z, Luckenbaugh DA, Salvatore G, Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate Jr. CA (2010) A randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression. *Arch Gen Psychiatry* 67:793-802.
27. Du J, Creson TK, Wu L-, Ren M, Gray NA, Falke C, Wei Y, Wang Y, Blumenthal R, Machado-Vieira R, Yuan P, Chen G, Zhuo M, Manji HK (2008) The role of hippocampal GluR1 i GluR2 receptors in manic-like behavior. *Journal of Neuroscience* 28:68-79.
28. Du J, Suzuki K, Wei Y, Wang Y, Blumenthal R, Chen Z, Falke C, Zarate Jr. CA, Manji HK (2007) The anticonvulsants lamotrigine, riluzole, and valproate differentially regulate AMPA receptor membrane localization: Relationship to clinical effects in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 32:793-802.
29. Du J, Gray NA, Falke CA, Chen W, Yuan P, Szabo ST, Einat H, Manji HK (2004a) Modulation of synaptic plasticity by antimanic agents: The role of AMPA glutamate receptor subunit 1 synaptic expression. *Journal of Neuroscience* 24:6578-6589.
30. Du J, Quiroz J, Yuan P, Zarate C, Manji HK (2004b) Bipolar disorder: involvement of signaling cascades and AMPA receptor trafficking at synapses. *Neuron Glia Biol* 1:231-243. DOI: doi:10.1017/S1740925X05000098.
31. Duman RS, Li N, Liu R-, Duric V, Aghajanian G (2012) Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 62:35-41.
32. Duman RS, Voleti B (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: Novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci* 35:47-56.
33. Eby GA, Eby KL (2006) Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Med Hypotheses* 67:362-370.

34. Esteban JA, Shi S-, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R (2003) PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 6:136-143.
35. Fan J, Vasuta OC, Zhang LYJ, Wang L, George A, Raymond LA (2010) N-Methyl-d-aspartate receptor subunit- and neuronal-type dependence of excitotoxic signaling through post-synaptic density 95. *J Neurochem* 115:1045-1056.
36. Feyissa AM, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B (2009) Reduced levels of NR2A i NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 33:70-75.
37. Fraga DB, Réus GZ, Abelaira HM, De Luca RD, Canever L, Pfaffenseller B, Colpo GD, Kapczinski F, Quevedo J, Zugno AI (2013) Ketamine alters behavior i decreases BDNF levels in the rat brain as a function of time after drug administration. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 35:262-266.
38. Frizel D, Coppen A, Marks V (1969) Plasma magnesium and calcium in depression. *British Journal of Psychiatry* 115:1375-1377.
39. Gatz M, Hurwicz ML (1990) Are old people more depressed? Cross-sectional data on Center for Epidemiological Studies Depression Scale factors. *Psychol Aging* 5:284-290.
40. Gilabert-Juan J, Castillo-Gomez E, Guirado R, Moltó MD, Nacher J (2012) Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Structure and Function*:1-15.
41. Goosens KA, Hobin JA, Maren S (2003) Auditory-evoked spike firing in the lateral amygdala and Pavlovian fear conditioning: mnemonic code or fear bias? *Neuron* 40:1013-1022.
42. Grubbs RD, Maguire ME (1987) Magnesium as a regulatory cation: Criteria and evaluation. *Magnesium* 6:113-127.
43. Harkin A, Kelly JP, Leonard BE (2003) A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. *Clinical Neuroscience Research* 3:253-262.
44. Harvey JA, Scholfield CN, Graham Jr. LT, Aprison MH (1975) Putative transmitters in denervated olfactory cortex. *J Neurochem* 24:445-449.
45. Hasey GM, D'Alessandro E, Cooke RG, Warsh JJ (1993) The interface between thyroid activity, magnesium, and depression: A pilot study. *Biol Psychiatry* 33:133-135.
46. Hashizume N, Mori M (1990) An analysis of hypermagnesemia and hypomagnesemia. *Jpn J Med* 29:368-372.
47. Heiden A, Frey R, Presslich O, Blasbichler T, Smetana R, Kasper S (1999) Treatment of severe mania with intravenous magnesium sulphate as a supplementary therapy. *Psychiatry Res* 89:239-246.
48. Heninger GR, Delgado PL, Charney DS (1996) The revised monoamine theory of depression: A modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry* 29:2-11.
49. Hevers W, Hadley SH, Lüddens H, Amin J (2008) Ketamine, but not phencyclidine, selectively modulates cerebellar GABA A receptors containing $\alpha 6$ and δ subunits. *Journal of Neuroscience* 28:5383-5393.
50. Ho Y-, Liu T-, Tai M-, Wen Z-, Chow RS-, Tsai Y-, Wong C- (2001) Effects of olfactory bulbectomy on NMDA receptor density in the rat brain: [3H] MK-801 binding assay. *Brain Res* 900:214-218.
51. Ibrahim L, Diazgranados N, Jolkovsky L, Brutsche N, Luckenbaugh DA, Joseph Herring W, Potter WZ, Zarate Jr. CA (2012) A randomized, placebo-controlled, crossover pilot trial of the oral selective NR2B antagonist MK-0657 in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 32:551-557.

52. Ibrahim L, Diazgranados N, Luckenbaugh DA, Machado-Vieira R, Baumann J, Mallinger AG, Zarate CA (2011) Rapid decrease in depressive symptoms with an N-methyl-d-aspartate antagonist in ECT-resistant major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 35:1155-1159.
53. Joly D, Sanger DJ (1986) The effects of fluoxetine and zimeldine on the behavior of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacology Biochemistry i Behavior* 24:199-204.
54. Jourdi H, Hsu Y-, Zhou M, Qin G, Bi X, Baudry M (2009) Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. *Journal of Neuroscience* 29:8688-8697.
55. Karolewicz B, Maclag D, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Feyissa AM, Rajkowska G (2010a) Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 13:411-420.
56. Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE (1997) The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. *Pharmacology i Therapeutics* 74:299-316.
57. Kim JJ, Ja WK, Lee HJ, Han J- (2005) Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. *Journal of Neuroscience* 25:1532-1539.
58. Kim JJ, Lee HJ, Han J-, Packard MG (2001) Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *Journal of Neuroscience* 21:5222-5228.
59. Kirov GK, Birch NJ, Steadman P, Ramsey RG (1994) Plasma magnesium levels in a population of psychiatric patients: Correlations with symptoms. *Neuropsychobiology* 30:73-78.
60. Kiss JP, Szasz BK, Fodor L, Mike A, Lenkey N, Kurkó D, Nagy J, Vizi ES (2012) GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. *Neurochem Int* 60:170-176.
61. Köhr G (2006) NMDA receptor function: Subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 326:439-446.
62. Kotermanski SE, Johnson JW (2009) Mg²⁺ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *Journal of Neuroscience* 29:2774-2779.
63. Krystal JH, Sanacora G, Duman RS (2013) Rapid-acting glutamatergic antidepressants: The path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry* 73:1133-1141.
64. Kubera M, Symbirtsev A, Basta-Kaim A, Borycz J, Roman A, Papp M, Claesson M (1996) Effect of chronic treatment with imipramine on interleukin 1 and interleukin 2 production by splenocytes obtained from rats subjected to a chronic mild stress model of depression. *Pol J Pharmacol* 48:503-506.
65. Lakshminarasimhan H, Chattarji S (2012) Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala. *PLoS ONE* 7.
66. LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience* 23:155-184.
67. Lee H-, Kirkwood A (2011) AMPA receptor regulation during synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. *Seminars in Cell i Developmental Biology* 22:514-520.
68. Lee H-, Takamiya K, He K, Song L, Huganir RL (2010) Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. *J Neurophysiol* 103:479-489.
69. Lemogne C, Delaveau P, Freton M, Guionnet S, Fossati P (2012) Medial prefrontal cortex and the self in major depression. *J Affect Disord* 136:e1-e11.
70. Leonard BE (1984) The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Pol J Pharmacol Pharm* 36:561-569.

71. Li N, Liu R-, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li X-, Aghajanian G, Duman RS (2011) Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* 69:754-761.
72. Li N, Lee B, Liu R-, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li X-, Aghajanian G, Duman RS (2010) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329:959-964.
73. Lima-Ojeda JM, Vogt MA, Pfeiffer N, Dormann C, Köhr G, Sprengel R, Gass P, Inta D (2013) Pharmacological blockade of GluN2B-containing NMDA receptors induces antidepressant-like effects lacking psychotomimetic action and neurotoxicity in the perinatal and adult rodent brain. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 45:28-33.
74. Linder J, Brismar K, Beck-Friis J, Saaf J, Wetterberg L (1989) Calcium and magnesium concentrations in affective disorder: Difference between plasma and serum in relation to symptoms. *Acta Psychiatr Sci* 80:527-537.
75. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25:402-408.
76. Lloyd KG, Morselli PL, Depoortere H, Fournier V, Zivkovic B, Scatton B, Broekkamp C, Worms P, Bartholini G (1983) The potential use of GABA agonists in psychiatric disorders: Evidence from studies with progabide in animal models and clinical trials. *Pharmacology, Biochemistry i Behavior* 18:957-966.
77. Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G (1996) Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res* 730:32-39. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00427-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(96)00427-1).
78. Lumia AR, Teicher MH, Salchli F, Ayers E, Possidente B (1992) Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain Res* 587:181-185.
79. Luo K-, Hong C-, Liou Y-, Hou S-, Huang Y-, Tsai S- (2010) Differential regulation of neurotrophin S100B i BDNF in two rat models of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 34:1433-1439.
80. MacHado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla A, Grando J, Brocardo PS, Bettio LEB, Capra JC, Rodrigues ALS (2012) Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. *Pharmacology Biochemistry i Behavior* 103:220-229.
81. Maeng S, Zarate Jr. CA, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK (2008) Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of α-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. *Biol Psychiatry* 63:349-352.
82. Maj M, Pirozzi R, Magliano L, Bartoli L (2003) Agitated depression in bipolar I disorder: Prevalence, phenomenology, and outcome. *Am J Psychiatry* 160:2134-2140.
83. Margoshes M (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79:4813-4814.
84. Mathews DC, Henter ID, Zarate Jr. CA (2012) Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: Rationale and progress to date. *Drugs* 72:1313-1333.
85. MCCARTHY DA, CHEN G, KAUMP DH, ENSOR C (1965) GENERAL ANESTHETIC AND OTHER PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF 2-(O-CHLOROPHENYL)-2-METHYLAMINO CYCLOHEXANONE HCL (CI-58L). *J New Drugs* 28:21-33.
86. McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.

87. Mealing GAR, Lanthorn TH, Small DL, Murray RJ, Mattes KC, Comas TM, Morley P (2001) Structural modifications to an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist result in large differences in trapping block. *J Pharmacol Exp Ther* 297:906-914.
88. Mealing GAR, Lanthorn TH, Murray CL, Small DL, Morley P (1999) Differences in degree of trapping of low-affinity uncompetitive N- methyl-D-aspartic acid receptor antagonists with similar kinetics of block. *J Pharmacol Exp Ther* 288:204-210.
89. Meyer TE, Habener JF (1993) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr Rev* 14:269-290.
90. Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR, Davis M (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345:716-718.
91. Miyashita T, Oda Y, Horiuchi J, Yin JCP, Morimoto T, Saitoe M (2012) Mg²⁺ Block of Drosophila NMDA Receptors Is Required for Long-Term Memory Formation and CREB-Dependent Gene Expression. *Neuron* 74:887-898.
92. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: A novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience* 17:2921-2927.
93. Murck H (2013) Ketamine, magnesium and major depression - From pharmacology to pathophysiology i back. *J Psychiatr Res* 47:955-965.
94. Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
95. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002a) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
96. Nestler EJ, Terwilliger RZ, Duman RS (1989) Chronic antidepressant administration alters the subcellular distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat frontal cortex. *J Neurochem* 53:1644-1647.
97. Nowak G, Szewczyk B, Wieronska JM, Branski P, Palucha A, Pilc A, Sadlik K, Piekoszewski W (2003) Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. *Brain Res Bull* 61:159-164.
98. Nowak G (1996) Calcium antagonists in the olfactory bulbectomy animal model of depression: Effect on the cortical NMDA receptor complex. *Pol J Pharmacol* 48:137-143.
99. Orser B, Smith D, Henderson S, Gelb A (1997) Magnesium deficiency increases ketamine sensitivity in rats. *Canadian Journal of Anaesthesia* 44:883-890.
100. Palucha A, Pilc A (2005) The involvement of glutamate in the pathophysiology of depression. *Drug News i Perspectives* 18:262-268.
101. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 14:383-400.
102. Paoletti P, Neyton J, Ascher P (1995) Glycine-independent and subunit-specific potentiation of NMDA responses by extracellular Mg²⁺. *Neuron* 15:1109-1120.
103. Patel AB, De Graaf RA, Martin DL, Battaglioli G, Behar KL (2006) Evidence that GAD65 mediates increased GABA synthesis during intense neuronal activity in vivo. *J Neurochem* 97:385-396.
104. Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Acad Press Inc, New York
105. Phelps LE, Brutsche N, Moral JR, Luckenbaugh DA, Manji HK, Zarate Jr. CA (2009) Family History of Alcohol Dependence and Initial Antidepressant Response to an N-methyl-D-aspartate Antagonist. *Biol Psychiatry* 65:181-184.

106. Pilc A, Wieronska JM, Skolnick P (2013) Glutamate-based antidepressants: Preclinical psychopharmacology. *Biol Psychiatry* 73:1125-1132.
107. *Pochwat B, Szewczyk B, Sowa-Kucma M, Siwek A, Doboszewska U, Piekoszewski W, Gruca P, Papp M, Nowak G (2013) Antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild stress model in rats: alterations in the NMDA receptor subunits. *Int J Neuropsychopharmacol*:1-13.
108. Poleszak E (2008) Benzodiazepine/GABAA receptors are involved in magnesium-induced anxiolytic-like behavior in mice. *Pharmacological Reports* 60:483-489.
109. Poleszak E, Szewczyk B, Wlaż A, Fidecka S, Wlaż P, Pilc A, Nowak G (2008a) D-serine, a selective glycine/N-methyl-D-aspartate receptor agonist, antagonizes the antidepressant-like effects of magnesium and zinc in mice. *Pharmacological Reports* 60:996-1000.
110. Poleszak E, Wlaż P, Wróbel A, Fidecka S, Nowak G (2008b) NMDA/glutamate mechanism of magnesium-induced anxiolytic-like behavior in mice. *Pharmacological Reports* 60:655-663.
111. Poleszak E, Wlaż P, Kedzierska E, Nieoczym D, Wróbel A, Fidecka S, Pilc A, Nowak G (2007) NMDA/glutamate mechanism of antidepressant-like action of magnesium in forced swim test in mice. *Pharmacology Biochemistry i Behavior* 88:158-164.
112. Poleszak E, Wlaż P, Kędzierska E, Radziwon-Zaleska M, Pilc A, Fidecka S, Nowak G (2005a) Effects of acute and chronic treatment with magnesium in the forced swim test in rats. *Pharmacological Reports* 57:654-658.
113. Poleszak E, Wlaż P, Szewczyk B, Kędzierska E, Wyska E, Librowski T, Szymura-Oleksiak J, Fidecka S, Pilc A, Nowak G (2005b) Enhancement of antidepressant-like activity by joint administration of imipramine and magnesium in the forced swim test: Behavioral and pharmacokinetic studies in mice. *Pharmacology Biochemistry i Behavior* 81:524-529.
114. Poleszak E, Szewczyk B, Kędzierska E, Wlaż P, Pilc A, Nowak G (2004) Antidepressant- and anxiolytic-like activity of magnesium in mice. *Pharmacology Biochemistry i Behavior* 78:7-12.
115. Preskorn SH, Baker B, Kolluri S, Menniti FS, Krams M, Landen JW (2008) An Innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective n-methyl-d-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28:631-637.
116. Quan M-, Zhang N, Wang Y-, Zhang T, Yang Z (2011) Possible antidepressant effects and mechanisms of memantine in behaviors and synaptic plasticity of a depression rat model. *Neuroscience* 182:88-97.
117. Riedel G, Platt B, Micheau J (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140:1-47.
118. Robichaud M, Beauchemin V, Lavoie N, Dennis T, Debonnel G (2001) Effects of bilateral olfactory bulbectomy on N-methyl-D-aspartate receptor function: autoradiographic and behavioral studies in the rat. *Synapse* 42:95-103.
119. Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R (2013) The role of metallothionein in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences* 14:6044-6066.
120. Ryan MF (1991) The role of magnesium in clinical biochemistry: An overview. *Ann Clin Biochem* 28:19-26.
121. Sanacora G, Smith MA, Pathak S, Su H-, Boeijinga PH, McCarthy DJ, Quirk MC (2013) Lanicemine: a low-trapping NMDA channel blocker produces sustained antidepressant efficacy with minimal psychotomimetic adverse effects. *Mol Psychiatry*.
122. Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008) Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 7:426-437.

123. Sanacora G, Mason GF, Krystal JH (2000) Impairment of GABAergic transmission in depression: New insights from neuroimaging studies. *Crit Rev Neurobiol* 14:23-45.
124. Sánchez C, Gruca P, Bien E, Papp M (2003) R-citalopram counteracts the effect of escitalopram in a rat conditioned fear stress model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry i Behavior* 75:903-907.
125. Santos CRA, Martinho A, Quintela T, Gonçalves I (2012) Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *IUBMB Life* 64:126-135. DOI: 10.1002/iub.585.
126. Santos MA, Rocha FL, Hara C (2008) Efficacy and safety of antidepressant augmentation with lamotrigine in patients with treatment-resistant depression: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry* 10:187-190.
127. Sartori SB, Whittle N, Hetzenauer A, Singewald N (2012) Magnesium deficiency induces anxiety and HPA axis dysregulation: Modulation by therapeutic drug treatment. *Neuropharmacology* 62:304-312.
128. Scapagnini G, Davinelli S, Drago F, De Lorenzo A, Oriani G (2012) Antioxidants as antidepressants: Fact or fiction? *CNS Drugs* 26:477-490.
129. Serefko A, Szopa A, Wlaz P, Nowak G, Radziwon-Zaleska M, Skalski M, Poleszak E (2013) Magnesium in depression. *Pharmacological Reports* 65:547-554.
130. Sher L (2011) Brain-derived neurotrophic factor and suicidal behavior in adolescents. *World Journal of Pediatrics* 7:197-198.
131. Singewald N, Sinner C, Hetzenauer A, Sartori SB, Murck H (2004) Magnesium-deficient diet worsens depression- and anxiety-related behavior in mice - Influence of desipramine and Hypericum perforatum extract. *Neuropharmacology* 47:1189-1197.
132. Skolnick P, Popik P, Trullas R (2009) Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol Sci* 30:563-569.
133. Skolnick P (1999) Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol* 375:31-40.
134. Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R (1996) Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: Implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry* 29:23-26.
135. Slotnick BM (1973) Fear behavior and passive avoidance deficits in mice with amygdala lesions. *Physiology i Behavior* 11:717-720.
136. Slutsky I, Abumaria N, Wu L, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao M, Zhuo M, Tonegawa S, Liu G (2010) Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron* 65:165-177. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.12.026.
137. Sluzewska A, Szczawinska K (1996) The effect of lithium potentiation of antidepressants in chronic mild stress model of depression in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 6:56.
138. Song C, Leonard BE (1994) The effects of chronic lithium chloride administration on some behavioural and immunological changes in the bilaterally olfactory bulbectomized rat. *Journal of Psychopharmacology* 8:40-47.
139. Song C, Leonard BE (2005) The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29:627-647.
140. Sowa-Kućma M, Legutko B, Szewczyk B, Novak K, Znojek P, Poleszak E, Papp M, Pilc A, Nowak G (2008) Antidepressant-like activity of zinc: Further behavioral and molecular evidence. *J Neural Transm* 115:1621-1628.
141. Stahl SM (2009) *Stahl's Essential Psychopharmacology: The Prescriber's Guide*. Cambridge University Press.
142. Stahl SM (2008) *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*. Cambridge University Press.

143. Svenningsson P, Bateup H, Qi H, Takamiya K, Huganir RL, Spedding M, Roth BL, McEwen BS, Greengard P (2007) Involvement of AMPA receptor phosphorylation in antidepressant actions with special reference to tianeptine. *Eur J Neurosci* 26:3509-3517.
144. Svenningsson P, Tzavara ET, Witkin JM, Fienberg AA, Nomikos GG, Greengard P (2002) Involvement of striatal and extrastriatal DARPP-32 in biochemical and behavioral effects of fluoxetine (Prozac). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3182-3187.
145. Szewczyk B, Poleszak E, Sowa-Kućna M, Siwek M, Dudek D, Ryszewska-Pokraśniewicz B, Radziwoń-Zaleska M, Opoka W, Czekaj J, Pilc A, Nowak G (2008) Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacological Reports* 60:588-599.
146. Szewczyk B, Pałucha-Poniewiera A, Poleszak E, Pilc A, Nowak G (2012) Investigational NMDA receptor modulators for depression. *Expert Opin Investig Drugs* 21:91-102. DOI: 10.1517/13543784.2012.638916.
147. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405-496.
148. Van Hooymissen JD, Chambliss HO, Holmes PV, Dishman RK (2003) Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. *Brain Res* 974:228-235.
149. Van Lockeren Campagne M, Thibodeaux H, Van Bruggen N, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG (1999) Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12870-12875.
150. Van Riezen H, Leonard BE (1990) Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacology and Therapeutics* 47:21-34.
151. Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *Journal of Neuroscience* 22:6810-6818.
152. Wang D, Noda Y, Tsunekawa H, Zhou Y, Miyazaki M, Senzaki K, Nabeshima T (2007) Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. *Behav Brain Res* 178:262-273.
153. Wang PS, Simon G, Kessler RC (2003) The economic burden of depression and the cost-effectiveness of treatment. *International Journal of Methods in Psychiatric Research* 12:22-33.
154. Webster HH, Flores G, Marcotte ER, Cecyre D, Quirion R, Srivastava LK (2000) Olfactory bulbectomy alters NMDA receptor levels in the rat prefrontal cortex. *Synapse* 37:159-162.
155. Whalen PJ, Shin LM, Somerville LH, McLean AA, Kim H (2002) Functional neuroimaging studies of the amygdala in depression. *Semin Clin Neuropsychiatry* 7:234-242.
156. Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural- neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90-110.
157. Willner P, Muscat R, Papp M (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16:525-534.
158. Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen H- (2011) The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology* 21:655-679.
159. Wlaz P, Kasperek R, Wlaz A, Szumilo M, Wróbel A, Nowak G, Poleszak E (2011) NMDA and AMPA receptors are involved in the antidepressant-like activity of tianeptine in the forced swim test in mice. *Pharmacological Reports* 63:1526-1532.

160. Workman ER, Niere F, Raab-Graham KF (2013) mTORC1-dependent protein synthesis underlying rapid antidepressant effect requires GABABR signaling. *Neuropharmacology* 73:192-203.
161. Wrynn AS, Mac Sweeney CP, Franconi F, Lemaire L, Pouliquen D, Herlidou S, Leonard BE, Gandon J-, De Certaines JD (2000) An in-vivo magnetic resonance imaging study of the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Brain Res* 879:193-199.
162. Yu X, Guo J, Fang H, Peng S (2011) Basal metallothionein-I/II protects against NMDA-mediated oxidative injury in cortical neuron/astrocyte cultures. *Toxicology* 282:16-22.
163. Zarate Jr. CA, Mathews D, Ibrahim L, Chaves JF, Marquardt C, Ukoh I, Jolkovsky L, Brutsche NE, Smith MA, Luckenbaugh DA (2013) A randomized trial of a low-trapping nonselective N-methyl-D-aspartate channel blocker in major depression. *Biol Psychiatry* 74:257-264.
164. Zarate Jr. CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK (2006) A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:856-864.
165. Zhou W, Wang N, Yang C, Li X, Zhou Z, Yang J- Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR i BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *European Psychiatry*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpsy.2013.10.005>.
166. Zhu W, Wang S, Liu M-, Shi H, Zhang R, Liu J, Ding Z, Lu L (2013) Glycine site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist 7-CTKA produces rapid antidepressant-like effects in male rats. *Journal of Psychiatry i Neuroscience* 38:306-316.