

Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Agnieszka Cichy

**BADANIE PRZECIWDEPRESYJNYCH
MECHANIZMÓW DZIAŁANIA JONÓW
CYNKU**

Rozprawa doktorska

Promotor: **prof. dr hab. Gabriel Nowak**

Pracę wykonano w **Pracowni Badań Receptorowych Katedry
Farmakologii UJ CM**

Kraków 2009

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi

Panu prof. dr hab. Gabrielowi Nowakowi

*za cenne rady i wskazówki w trakcie wykonywania
pracy eksperymentalnej, oraz
za życzliwość, pogodę ducha i wyrozumiałość.*

*Dziękuję mojej Rodzinie
za cierpliwość i wsparcie.*

*Dziękuję mojej przyjaciółce Małgorzacie Korlatowicz
za pomoc i dobre słowo.*

*Dziękuję koleżankom i kolegom z Pracowni Badań
Receptorowych
za okazaną życzliwość i pomoc.*

*„Gdy czuje się ciemność w sobie,
ciemności panują też na zewnątrz,
a gdy wewnątrz jest jaśniejsze,
to i świat otaczający staje się piękniejszy.”*

Antoni Kępiński

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----------|
| <i>Spis treści</i> | 1 |
| <i>Wykaz skrótów</i> | 5 |
| <i>Nazwy chemiczne związków</i> | 6 |
| WSTĘP | 7 |
| DEPRESJA | 7 |
| Definicja | 7 |
| Rozpowszechnienie | 9 |
| Leczenie depresji. | 10 |
| Depresje lekooporne | 12 |
| Przedkliniczne metody oceny działania przeciwdepresyjnego | 13 |
| Testy biochemiczne | 13 |
| Testy behawioralne i modele depresji | 13 |
| Hipotezy depresji i kierunki poszukiwań nowych LPD. | 16 |
| Hipoteza monoaminergiczna | 16 |
| Hipoteza zmian adaptacyjnych | 17 |
| Hipoteza przewlekłego stresu | 19 |
| Hipoteza troficzna | 20 |
| Hipoteza zaburzeń neuroplastyczności oraz hipoteza sieci neuronalnej | 22 |
| ROLA UKŁADU GLUTAMINIANERGICZNEGO W PATOMECHANIZMIE | |
| DEPRESJI | 24 |
| Budowa i funkcja układu glutaminianergicznego | 24 |
| Układ glutaminianergiczny w patofizjologii i leczeniu depresji | 33 |
| CYNK W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM | 40 |
| Cynk w organizmie człowieka | 40 |
| Zawartość i rozmieszczenie cynku w mózgu | 40 |
| Transport cynku do mózgu | 41 |
| Pule cynku w mózgu | 42 |
| Magazynowanie cynku w neuronie. Transportery cynku | 43 |
| Uwalnianie i wychwyty zwrotny | 45 |
| CYNK W PATOFIZJOLOGII DEPRESJI | 48 |
| Historia badań | 48 |
| Badania eksperymentalne na zwierzętach - testy biochemiczne | 49 |

| | |
|---|-----------|
| Badania eksperymentalne na zwierzętach - testy behawioralne i modele depresji | 50 |
| Badania kliniczne..... | 51 |
| Potencjalne mechanizmy przeciwdepresyjnego działania jonów cynku..... | 52 |
| MODULACJA TRANSMISJI NEURONALNEJ PRZEZ JONY CYNKU..... | 56 |
| Wpływ na pozostałe receptory dla neuroprzekaźników..... | 56 |
| Wpływ cynku na transportery dla neuroprzekaźników..... | 59 |
| CEL PRACY | 63 |
| MATERIAŁY I METODY..... | 64 |
| Zwierzęta | 64 |
| Schemat podawania związków..... | 64 |
| Badania biochemiczne | 65 |
| Wiązanie [³ H]Prazosyny do receptora α_1 w korze mózgowej myszy | 65 |
| Wiązanie [³ H]Klonidyny do receptora α_2 w korze mózgowej myszy..... | 66 |
| Wiązanie [³ H]CGP 12177 do receptora β_1 w korze mózgowej myszy | 67 |
| Wiązanie [³ H]8-OH-DPAT do receptora 5-HT _{1A} w hipokampie szczura..... | 67 |
| Wiązanie [³ H]Ketanseryny do receptora 5-HT _{2A} w korze mózgowej szczura..... | 68 |
| Wiązanie [³ H]MPEP do receptora mGluR5 w korze mózgowej..... | 69 |
| Wiązanie [³ H]L-689 560 do miejsca glicynowego kompleksu receptora NMDA w korze mózgowej szczura | 70 |
| Badania behawioralne | 71 |
| Stosowane związki..... | 71 |
| Test wymuszonego pływania (FST) u myszy | |
| Test wymuszonego pływania (FST) u szczurów..... | 72 |
| Test spontanicznej aktywności lokomotorycznej u myszy | 74 |
| Analizy statystyczne | 74 |
| WYNIKI | 75 |
| Badania biochemiczne- radioreceptorowe..... | 75 |
| Analiza dwupunktowa wiązania [³ H]Prazosyny do receptora α_1 -adrenergicznego w korze mózgowej myszy..... | 75 |
| Analiza dwupunktowa wiązania [³ H]Klonidyny do receptora α_2 -adrenergicznego w korze mózgowej myszy | 76 |
| Analiza dwupunktowa wiązania [³ H]CGP 12177 do receptora β_1 -adrenergicznego w korze mózgowej myszy | 77 |
| Analiza dwupunktowa wiązania [³ H]8OH-DPAT receptora serotonergicznego 5-HT _{1A} w hipokampie szczura | 78 |
| Analiza saturacyjna – wiązanie [³ H]8-OH-DPAT do receptora 5-HT _{1A} w hipokampie szczura | 80 |

| | |
|--|------------|
| Analiza dwupunktowa wiązania [³ H]Ketanseryny do receptora serotonergicznego 5-HT ₂ w korze mózgowej szczura..... | 81 |
| Analiza saturacyjna – wiązanie [³ H]Ketanseryny do receptora 5-HT ₂ w korze mózgowej szczura | 83 |
| Analiza saturacyjna – wiązanie [³ H]MPEP do receptora mGluR5 w korze mózgowej szczura | 84 |
| Analiza inhibicyjna – badanie powinowactwa glicyny do miejsca glicynowego kompleksu receptora NMDA w korze mózgowej szczura przy zastosowaniu liganda [³ H]L-689 560 | 85 |
| 2 Badania behawioralne | 87 |
| Wyznaczanie dawki aktywnej cynku w teście wymuszonego pływania wg Porsolta..... | 87 |
| Badanie udziału receptorów 5-HT _{1A} i 5-HT _{2A/C} w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku w teście wymuszonego pływania..... | 88 |
| Badanie udziału receptorów NMDA w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku w teście wymuszonego pływania..... | 90 |
| Badanie udziału receptorów AMPA w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku w teście wymuszonego pływania..... | 94 |
| Ocena komponenty serotonergicznego cynku w teście wymuszonego pływania u szczurów..... | 96 |
| Ocena komponenty glutaminianergicznego cynku w teście wymuszonego pływania u szczurów..... | 98 |
| Wpływ podania cynku i WAY100635 na aktywność lokomotoryczną myszy | 99 |
| Wpływ podania cynku i ritanseryny na aktywność lokomotoryczną myszy..... | 99 |
| Wpływ podania cynku i NMDA na aktywność lokomotoryczną myszy | 100 |
| Wpływ podania cynku i ligandów receptorów glutamatergicznych na aktywność lokomotoryczną myszy | 101 |
| Wpływ podania cynku i NBQX na aktywność lokomotoryczną myszy | 101 |
| DYSKUSJA | 103 |
| KOMPLEKS RECEPTORA NMDA W PRZECIWDOPRESYJNYM MECHANIZMIE DZIAŁANIA JONÓW CYNKU..... | 103 |
| Wpływ chronicznych podań cynku na powstawanie zmian adaptacyjnych receptora NMDA | 103 |
| Udział kompleksu receptora NMDA w mechanizmie przeciwdepresyjnej aktywności jonów cynku - test pływania | 106 |
| UDZIAŁ RECEPTORA AMPA W MECHANIZMIE PRZECIWDOPRESYJNEJ AKTYWNOŚCI JONÓW CYNKU..... | 108 |
| BRAK WPŁYWU PRZEWLEKŁYCH PODAŃ CYNKU NA POWSTAWANIE ZMIAN ADAPTACYJNYCH RECEPTORÓW METABOTROPOWYCH GLUR5..... | 109 |
| ROLA UKŁADU ADRENERGICZNEGO W PRZECIWDOPRESYJNEJ AKTYWNOŚCI JONÓW CYNKU..... | 111 |
| UKŁAD SEROTONINERGICZNY W PRZECIWDOPRESYJNYM MECHANIZMIE DZIAŁANIA JONÓW CYNKU..... | 112 |

Spis treści

| | |
|---|------------|
| Wpływ przewlekłych podań cynku na powstanie zmian adaptacyjnych receptorów układu serotonergicznego 5-HT _{1A} i 5-HT _{2A} | 113 |
| Udział receptorów układu serotonergicznego 5-HT _{1A} i 5-HT _{2A/C} w mechanizmie przeciwdepresyjnej aktywności jonów cynku- test pływania | 114 |
| <i>PODSUMOWANIE</i> | 118 |
| <i>WNIOSKI</i> | 119 |
| <i>STRESZCZENIE</i> | 120 |
| <i>ABSTRACT</i> | 122 |
| <i>Piśmiennictwo</i> | 124 |
| <i>Spis rycin i tabel</i> | 153 |
| Spis rycin | 153 |
| Spis tabel | 155 |

WYKAZ SKRÓTÓW

| | |
|------------------------|---|
| AC | - cyklaza adenylnowa |
| BDNF | - czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego |
| CA1, CA3 | - obszary/pola hipokampa |
| CaMKII | - kinaza białkowa II zależna od wapnia i kalmoduliny |
| cAMP | - cykliczny adenozynomonofosforan |
| CREB | - czynnik transkrypcyjny wrażliwy na cAMP |
| CUS | - przewlekły nieprzewidywalny stres |
| ECS | - elektrowstrząsy- model stosowany w badaniach na zwierzętach |
| ECT | - terapia elektrowstrząsowa- stosowana u ludzi |
| ERK | - kinazy białkowe aktywowane działaniem czynników zewnątrz- komórkowych (z grupy MAPK) |
| FST | - test wymuszonego pływania |
| Glu | - kwas glutaminowy |
| GLY_B | - miejsce wiązania glicyny na receptory NMDA |
| HPA | - podwzgórze-przysadka-nadnercza |
| 5-HT | - serotonina |
| <i>i.p.</i> | - dootrzewnowo |
| LPD | - leki przeciwdepresyjne |
| mGluR | - glutaminianergiczny receptor metabotropowy |
| mRNA | - kwas rybonukleinowy (matrycowy) |
| MAPK | - kinazy białkowe aktywowane mitogenami |
| MT | - metalotioneina |
| MT-I - MT-IV | - izoformy metalotioneiny |
| NA | - noradrenalina |
| NR1, NR2 | - podjednostki receptora NMDA |
| OB | - model usunięcia opuszek węchowych |
| OUN | - ośrodkowy układ nerwowy |
| PCP | - fencyklidyna |
| PKA | - kinaza białkowa A |
| PKC | - kinaza białkowa C |
| PLC | - fosfolipaza C |

| | |
|-------------------|--|
| SFK | - kinazy z rodziny Src |
| SNRI | - selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego noradrenaliny |
| SSRI | - selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny |
| TLPD | - trójcykliczne leki przeciwdepresyjne |
| TrkB | - kinaza tyrozynowa związana z tropomiozyną |
| TST | - test zawieszenia za ogon |
| ZnT1, ZnT3 | - transportery cynkowe |

NAZWY CHEMICZNE ZWIĄZKÓW

| | |
|-------------------|--|
| ACPC | -kwas 1-aminocyklopropanokarboksylowy |
| AMPA | -kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy |
| CaEDTA | -etylenodiaminoczteroocjan wysycany jonami wapniowymi |
| CGP 37849 | -kwas D,L-(E)- 2-amino-4-metylo-5-fosfono-3-pentenowy |
| CGP 39551 | -karboksyetylester kwasu D,L-(E) – 2-amino-4-metylo-5-fosfono 3-pentenowego |
| CX 614 | -2H,3H,6aH-pirolidyno(2'',1''-3',2')1,3-oksazyno(6',5'-5,4)benzeno(e)1,4-dioxan-10-on |
| GABA | -kwas γ -aminomasłowy |
| L-701,324 | 7-chloro-4-hydroksy-3-(3- fenoksy)fenylokwinolino-2[1H]-on |
| MK-801 | -maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepteno-5,10-imina |
| NMDA | -kwas N-metylo-D-asparaginowy |
| MPEP | -2-metylo-6-(fenyloetynylo)-pirydyna |
| MTEP | -3-[(2-metylo-1,3-tiazolilo)etynylo]-pirydyna |
| NBQX | -nitro-7-sulfamylobenzochinoksalino-2,3dion |
| NMDA | -kwas N-metylo-D-asparaginowy |
| WAY 100635 | -N-{2-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazyntylo]etyl}-N-(2-pirydynylo)cykloheksanokarboksamid |

WSTĘP

DEPRESJA

Pierwsza wzmianka na temat depresji pojawia się pod pojęciem **melancholii** (czarnej żółci) już w tekstach Hipokratesa. Kolejne opisy chorób psychicznych konkurują z interpretacjami teologicznymi, uznającymi melancholię jako karę za grzechy. W XVIII i XIX wieku podejście do tematu melancholii ogranicza się raczej do opisu objawów niż przyczyn. Nastawienie do chorób umysłowych ulega zmianie stopniowo, przez dziesięciolecia. Nowoczesne koncepcje depresji wywodzą się z końca XIX wieku, kiedy zaczyna się ją różnicować z innymi chorobami psychicznymi i ewoluuje do końca II wojny światowej, gdy następuje liberalizacja społeczeństwa, a chorzy uzyskują szerszy dostęp do opieki zdrowotnej. Wynalezienie pierwszych LPD (1957 rok, imipramina) oraz leczenie elektrowstrząsami dają początek nowej erze w historii tej choroby [Hallström i wsp. 2007, Dudek i wsp. 2002].

Definicja

Definicja depresji jest niejednorodna. Według europejskiego systemu diagnozy nozologicznej **ICD-10** (*International Classification of Diseases*), opublikowanego przez WHO (*World Health Organization*) jest to grupa schorzeń, o zróżnicowanej patogenezie określana obecnie zbiorczą nazwą "zaburzenia nastroju" (kod F30 - 39). System ten wyróżnia:

I Epizod depresyjny:

- łagodny
- umiarkowany
- ciężki bez objawów psychotycznych
- ciężki z objawami psychotycznymi
- inny
- nieokreślony

II Zaburzenia depresyjne nawracające

W epizodach depresyjnych pacjent cierpi z powodu obniżenia nastroju, ubytku energii, zmniejszenia aktywności. Zmniejszone jest odczuwanie przyjemności, zakres zainteresowań i koncentracja. Często pojawia się znaczne zmęczenie, nawet po niewielkim wysiłku. Samoocena i pewność siebie są zaniżone, nawet w łagodnych stanach depresyjnych pojawiają się idee winy i małej wartości. Obniżenie nastroju nie ulega większym zmianom, jest niezależne od bieżących wydarzeń, mogą mu towarzyszyć tzw. objawy "somatyczne": utrata zainteresowania przyjemnością i obniżenie zdolności do jej przeżywania, wczesne budzenie się (kilka godzin wcześniej niż zwykle), narastanie depresji w godzinach porannych, wyraźne zahamowanie psychoruchowe, utrata apetytu, ubytek masy ciała, utrata libido. Definicja obejmuje: pojedynczy epizod reakcji depresyjnej, depresji psychogennej, depresji reaktywnej.

Zaburzenia depresyjne nawracające cechują się powtarzającymi się epizodami depresji, opisanej jako epizod depresyjny, bez jakichkolwiek objawów wzmoczonego nastroju i zwiększonej energii (mania) w przeszłości. Bezpośrednio po epizodzie depresyjnym mogą jednak pojawić się krótkotrwałe stany wzmoczonego samopoczucia i aktywności (hipomania), niekiedy związane ze stosowaniem leczenia przeciwdepresyjnego. Definicja obejmuje nawracające epizody: reakcji depresyjnej, depresji psychogennej, depresji reaktywnej, sezonowych zaburzeń depresyjnych.

System Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego w podręczniku diagnostyki i statystyki chorób psychicznych - **DSM-IV** (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) zalicza depresję do "chorób afektywnych", określając epizod dużej depresji chorobą afektywną jednobiegunową (*major depressive disorder*), obok choroby afektywnej dwubiegunowej, dystymii, cyklotymii oraz zaburzeń afektywnych na podłożu schorzeń somatycznych i wywoływanych przez leki. Rozpoznanie choroby afektywnej wymaga stwierdzenia epizodów zaburzeń afektywnych, które nie są równoznaczne z diagnozą. Za kryteria rozpoznawania dużej depresji uważa się występowanie, co najmniej pięciu z wymienionych niżej objawów, które stanowią wyraźną zmianę w porównaniu ze stanem przedchorobowym, przez minimum dwa tygodnie, przy czym jednym z nich musi być obniżenie nastroju lub ograniczenie zainteresowań. Do objawów tych należą:

- obniżenie nastroju
- wyraźne ograniczenie zainteresowań lub odczuwania przyjemności dotyczące wszystkich lub niemal wszystkich czynności

- znaczny przyrost lub spadek masy ciała albo wzrost/utrata łaknienia
- bezsenność lub nadmierna senność
- pobudzenie lub spowolnienie psychoruchowe
- zmęczenie lub utrata energii
- poczucie niskiej wartości lub nieuzasadnionej winy
- zaburzenia koncentracji uwagi lub niezdecydowanie
- nawracające myśli o śmierci lub samobójstwie [1, Breslin 1998].

Rozpowszechnienie

Depresja jest najczęściej występującym zaburzeniem psychicznym. Szacuje się, że dotyka ona 121 milionów ludzi na świecie, a roczna chorobowość w populacji osób dorosłych wynosi 6-12%. Obecnie zajmuje czwarte miejsce na liście chorób o ciężkim przebiegu, kończących się przedwczesną śmiercią pacjentów, a według przewidywań WHO w roku 2020 przesunie się na drugie miejsce tej listy, ustępując jedynie chorobom układu krążenia. Jednak już dziś zajmuje drugą pozycję w kategorii wiekowej 15 - 44 lat dla obydwu płci, co oznacza, że choroba dotyka szczególnie ludzi w ich najbardziej produktywnym okresie życia. Relatywnie częściej na depresję zapadają kobiety, a na prewalencję nie mają wpływu ani rasa, ani grupa etniczna. Zauważalne obecnie wyższe wskaźniki rozpowszechnienia depresji w porównaniu z danymi sprzed lat to wynik poszerzenia kryteriów diagnostycznych, większej wykrywalności, ale również rzeczywistego wzrostu zachorowań.

Etiologia depresji nie zastała w pełni wyjaśniona, a dowody sugerują, że choroba ta jest wynikiem skomplikowanej interakcji pomiędzy czynnikami biologicznymi, genetycznymi, psychosocjalnymi i środowiskowymi [2, 3].

Podstawowym problemem jest śmiertelność związana z depresyjnymi zaburzeniami nastroju. Rocznie w wyniku samobójstw ginie 850000 osób. Sytuację pogarsza fakt, iż tylko 25% chorych ma dostęp do skutecznej terapii, chociaż właściwą diagnozę może postawić nawet lekarz pierwszego kontaktu.

Obecnie stosowane leki przeciwdepresyjne nie przynoszą poprawy aż u jednej trzeciej leczonych pacjentów. Istnieje, zatem konieczność poszukiwania nowych, skutecznych, a jednocześnie bezpiecznych dróg terapii. Istotnym ograniczeniem w badaniach nad nowymi LPD jest fakt, że wiedza na temat patofizjologii tego schorzenia nadal opiera się na hipotezach [Pałucha i wsp. 2005].

Leczenie depresji

Terapia farmakologiczna

Stosowane w klinice LPD można podzielić w oparciu o różne kryteria, jednak najbardziej uzasadniony wydaje się podział w oparciu o mechanizm działania farmakologicznego po podaniu jednorazowym. Podział ten uwzględnia tabela 1 [Maj 2000].

Terapia nefarmakologiczna

Obejmuje ona następujące metody:

- psychoterapię
 - fototerapię
 - deprivację snu
 - metody fizykalne:
 - elektrowstrząsy (ECT - ang. *electroconvulsive therapy*)
 - przezczaszkową stymulację magnetyczną (TMS - ang. *transcranial magnetic stimulation*)
 - elektryczną stymulację nerwu błędnego (VNS - ang. *vagus nerve stimulation*)
 - głęboką elektryczną stymulację mózgu (DBS - ang. *deep brain stimulation*)
- [Zyss i wsp. 2007].

| |
|--|
| <p>INHIBITORY WYCHWYTU ZWROTNEGO NA 1 5-HT:</p> <p><u>TRÓJPIERŚCIENIOWE - O DZIAŁANIU RECEPTOROWYM</u></p> <p>imipramina dezimipramina amitryptylina klomipramina</p> <p><u>NIE-TRÓJPIERŚCIENIOWE - BEZ DZIAŁANIA RECEPTOROWEGO</u></p> <p>wenlafaksyna milnacipran</p> |
| <p>SELEKTYWNE INHIBITORY WYCHWYTU NA (NSRI)</p> <p>maprotylina reboksetyna</p> |
| <p>SELEKTYWNE INHIBITORY WYCHWYTU 5-HT (SSRI)</p> <p>citalopram fluoksetyna fluwoksamina paroksetyna sertralina</p> |
| <p>INHIBITORY MAO (IMAO)</p> <p>NIESELEKTYWNE</p> <p>nialamid tranilcypromina</p> <p>SELEKTYWNE- MAO-A</p> <p>klorgilina moklobemid</p> <p>SELEKTYWNE- MAO-B</p> <p>Selegilina</p> |
| <p>NIETYPOWE</p> <p>trimipramina mianseryna mirtazapina trazodon tianeptyna bupropion amineptyna</p> |

Tab. 1. Podział LPD wg mechanizmu działania [z Maj 2000].

Depresje lekooporne

Największym problemem w leczeniu depresji, a równocześnie największym wyzwaniem dla klinicystów jest depresja lekooporna (**TRD** - ang. *treatment - resistant depression*). W rzeczywistości około jednej trzeciej pacjentów leczonych z powodu dużej depresji nie odpowiada satysfakcjonująco na pierwszy LPD [Souery i wsp. 1999]. Niestety nadal **brak jednorodnej definicji TRD** [Berlim i wsp. 2007, Tirney 2007, Carvalho i wsp. 2007]. Ogólnie terminem tym określa się depresje, które **nie odpowiadają na właściwe leczenie**, przy czym dotyczy to zarówno tych pacjentów, u których brak jest w ogóle odpowiedzi na leczenie, jak i tych, u których odpowiedź ta jest niewystarczająca [Tirney 2007]. Rozbieżność definicji waha się od niepowodzenia odpowiedzi na właściwe leczenie pojedynczym LPD przez minimum cztery tygodnie [Rose i wsp. 1986] po niepowodzenie w ostatniej, pojedynczej próbie terapii ECS [Fink 1991]. Obecnie Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne (APA) uważa, że jeśli, co najmniej umiarkowana poprawa, nie występuje w pomiędzy szóstym, a ósmym tygodniem od zastosowania pierwszej farmakoterapii, leczenie powinno być ponownie przeszacowane [1]. Pacjentom z TRD **proponuje się kilka strategii**: zwiększenie dawki stosowanego LPD, zmianę na LPD o innym mechanizmie działania, połączenie LPD z dwóch grup oraz terapię potęgującą [Bauer i wsp. 2002]. **Taktyka potęgowania** polega na użyciu leków, które nie należą do standardowych LPD, aby wzmocnić efekt terapeutyczny znanego LPD. Najbardziej udokumentowane działanie wzmacniające wykazuje **lit** [Bauer i wsp. 1999, 2000, Cowen i wsp. 1991] oraz **trójiodotyroksyna** [Aronson i wsp. 1996, Iosifescu i wsp. 2005, Abraham i wsp. 2006]. Wyniki dla buspironu i pindololu są mniej jednoznaczne. Poza tym testuje się prekursor serotoniny (tryptofan, 5-hydroksytryptofan), związki o działaniu dopaminergicznym (bromokryptyna, pergolid, amantadyna, pramipeksol i ropinirol), psychostymulanty (metylfenidat, dekstroamfetamina, modafinil), atypowe leki antypsychotyczne (risperidon, olanzapina, kwetiapina, aripiprazol, ziprasidon), leki przeciwpadaczkowe (kwas walproinowy, karbamazepina, gabapentyna), estrogeny, dihydroepiandrosteron, deksametazon, inozytol, S- adenosylmetioninę, antyglukokortykoidy (ketokonazol, aminoglutetimid, metyrapon), kwasy tłuszczowe z rodziny Omega 3, ketaminę, żelazo [Carvalho i wsp. 2007] oraz **jony cynku** [Nowak i wsp. 2003]. Mimo, że wyniki badań wydają się być obiecujące, większość strategii potęgujących wymaga dobrze zaplanowanych prób klinicznych, przeprowadzonych na szeroką skalę, zanim zostaną użyte w rutynowej praktyce klinicznej w leczeniu TRD.

PRZEDKLINICZNE METODY OCENY DZIAŁANIA PRZECIWDOPRESYJNEGO

Do wstępnej oceny działania przeciwdepresyjnego nowych związków używa się testów skryningowych. Uwzględnia się podział na testy biochemiczne, farmakologiczne, neurochemiczne i behawioralne [Popik 1996]. Przedstawione zostaną tu głównie wybrane testy przydatne w niniejszej pracy.

Testy biochemiczne

Pozwalają określić profil działania farmakologicznego badanych związków. Należą do nich metody radioreceptorowe: analiza inhibicyjna - określająca powinowactwo badanych substancji oraz analiza saturacyjna - określająca zmiany receptorowe zachodzące pod wpływem badanych związków [Bylund i wsp. 1990, Nowak i wsp. 1999a].

Testy behawioralne i modele depresji

Powszechnie wykorzystywane do oceny działania przeciwdepresyjnego danego związku, a ich największą zaletą jest brak działania destrukcyjnego dla zwierząt. W testach behawioralnych manipulacje warunkami środowiskowymi wywołują zmiany w zachowaniu zwierząt, które są modulowane przez LPD. Do najczęściej stosowanych zaliczamy:

- **Test wymuszonego pływania (*forced swim test* - FST)**

Polega on na zanurzeniu zwierząt w cylindrycznym naczyniu z letnią wodą, do wysokości uniemożliwiającej zwierzęciu swobodne stanie na dnie. W takiej sytuacji zwierzęta usiłują wydostać się z cylindra, lecz po pewnym czasie rezygnują i utrzymują się nieruchomo na powierzchni wody. Mierzony jest czas bezruchu (rezygnacji). LPD wydłużają czas prób wydostania się zwierząt (skracają czas bezruchu). Głównie stosowany wg metody Porsolta, istnieje też wiele modyfikacji [Porsolt i wsp. 1977, 1978, 2001, Detke i wsp. 1996, Lucki 1997, Bourin i wsp. 2005, Petit-Demouliere i wsp. 2005].

- **Test zawieszenia za ogon (*tail suspension test* - TST)**

Zbliżony pod względem koncepcji teoretycznej do testu pływania. Polega na uwiązaniu za ogon i podwieszeniu w powietrzu myszy, które usiłują uwolnić się z nieprzyjemnej dla nich sytuacji. Rejestruje się czas aktywnych wysiłków prowadzących do uwolnienia się lub też czas bezruchu [Steru i wsp. 1985., Porsolt i wsp. 2001, Bourin i wsp. 2005, Cryan i wsp. 2005].

Poza testami behawioralnymi stosuje się również modele (symulacje depresji) w celu maksymalnego zbliżenia niechorujących na depresję zwierząt do sytuacji klinicznej. Pozwalają one zbadać czynniki związane z etiologią, patogenezą, symptomatologią oraz leczeniem depresji [Popik 1996]. Do najczęściej wykorzystywanych należą:

- **Model chronicznego łagodnego stresu (*chronic mild stress*)**

Łagodne bodźce stresowe, takie jak: niewielkie zmiany temperatury, oświetlenia i liczebności zwierząt w klatkach oraz epizody deprywacji pokarmowej stosuje się naprzemiennie i w sposób ciągły przez kilka tygodni. Efektem tych działań są zmiany w zachowaniu zwierząt (spadek spożywania roztworu cukru, zmniejszenie reakcji samodrażnienia oraz warunkowej preferencji miejsca spowodowanej czynnikami nagradzającymi), interpretowane jako anhedonia. Zjawisko to należy do głównych objawów depresji u ludzi. Zmiany w zachowaniu zwierząt utrzymują się przez wiele tygodni po zaprzestaniu stosowania bodźców stresowych. LPD odwracają deficyt behawioralny u stresowanych zwierząt [Willner 1990, 1997, 2005, Papp i wsp. 1996].

- **Model przewlekłego nieprzewidywalnego stresu (*chronic unpredictable stress*)**

Bodźce stresowe, takie jak: szok elektryczny, zanurzenie w zimnej wodzie, zadawanie bólu uciskiem ogona, unieruchomienie, zmiany oświetlenia i liczebności zwierząt w klatkach, stosowane przez około trzy tygodnie wywołują odpowiedzi w zachowaniu zwierząt związane z motywacyjną wartością bodźców. Wyrażają się one osłabieniem reakcji samodrażnienia, zmniejszeniem spożywania roztworu sacharozy, osłabieniem zdolności uczenia się i apatią, mierzoną zmniejszeniem aktywności eksploracyjnej i wydłużeniem czasu bezruchu w teście pływania. LPD zapobiegają powstawaniu zmian behawioralnych w trakcie trwania eksperymentu, ale nie odwracają zmian już istniejących. Model ten uważany jest za jeden z najdoskonalszych modeli depresji (depresja powstrząsowa) [Popik 1996, Krocza i wsp. 2001].

▪ **Uszkodzenie opuszek węchowych (*olfactory bulbectomy*)**

Zabieg bulbektomii (chirurgicznego usunięcia opuszek węchowych), którego istotą jest nie tylko pozbawienie zwierząt odczuwania zapachów, ale także wykrywania feromonów, prowadzi do szeregu zmian w zachowaniu. Objawiają się one zwiększeniem pobudliwości, ruchliwości i drażliwości, wyrażonych agresją w stosunku do innych zwierząt, osłabieniem odruchu biernego unikania i nasileniem odruchu aktywnego unikania. Badania neurochemiczne pokazują zmniejszenie obrotu noradrenaliny i serotoniny w korze czółowej, zwiększony obrót GABA, wzrost poziomu kortykosterydów we krwi. Wydaje się, że model ten odzwierciedla niektóre cechy charakterystyczne dla depresji agitowanej lub manii. Podanie LPD odwraca zmiany w zachowaniu [Van Riezen i wsp. 1977, Popik 1996, Song i wsp. 2005].

▪ **Przewlekły stres psychospołeczny**

Nowym i szczególnie interesującym wydaje się zwierzęcy model depresji, w którym wykorzystuje się samce wiewióreczników (*Tupaia belangeri*), nienależące do gryzoni. U zwierząt tych występuje silny terytorializm, który wykorzystuje się do stworzenia naturalnie występującej sytuacji wyzwania, kontrolowanej w warunkach laboratoryjnych. Kiedy podporządkowany samiec pozostaje w kontakcie wzrokowym i węchowym z samcem tego samego gatunku, przez którego został wcześniej pokonany, dochodzi u niego do drastycznej zmiany zachowania, procesów fizjologicznych, endokrynych oraz aktywności o.u.n. Zmiany te są podobne do objawów obserwowanych u osób chorych na depresję, a model ten nazwano modelem przewlekłego stresu psychospołecznego. Co więcej LPD odwracają zmiany behawioralne i neuroendokryne wywołane stresem w tym modelu [Fuchs 2004].

HIPOTEZY DEPRESJI I KIERUNKI POSZUKIWAŃ NOWYCH LPD

Hipoteza monoaminergiczna

Przypadkowe odkrycie w 1957 roku przeciwdepresyjnego działania imipraminy, leku hamującego wychwyty zwrotne noradrenaliny i serotoniny, oraz iproniazydu, blokującego metabolizm tych monoamin, skierowało na kilkadziesiąt lat uwagę badaczy na układy monoaminergiczne i zaowocowało wprowadzeniem szeregu nowych LPD. Hipoteza monoaminergiczna, wysunięta w **1965 roku przez Schildkrauta**, zakłada, że przyczyną depresji jest **niedobór monoamin** w mózgu, a mechanizm działania LPD ogranicza się do podnoszenia poziomu serotoniny (5-HT) i noradrenaliny (NA) w szczelinie synaptycznej poprzez hamowanie ich wychwyty zwrotnego lub metabolizmu [Schildkraut 1965, Coppen 1967, Nowakowska i wsp. 2005, Pilc i wsp. 2000, Belmaker i wsp. 2008, Elhwuegi 2004]. Teorię deficytu monoamin potwierdzają badania przeprowadzone na pacjentach cierpiących na depresję, u których zaobserwowano: nawrót choroby przy zahamowaniu hydroksylazy tyrozynowej lub niedoborze tryptofanu w diecie [Ruhé i wsp. 2007], zwiększoną częstotliwość mutacji dotyczących specyficznej dla mózgu hydroksylazy tryptofanu (TPH-2) [Zhang i wsp. 2005], zwiększenie wiązania specyficznego liganda do MAO-A [Meyer i wsp. 2006], podwrażliwość receptora 5-HT_{1A} [Pitchot i wsp. 2005], defekt receptora 5-HT_{1B}, obniżony poziom białka p11 [Svenningsson i wsp. 2006], nieprawidłową odpowiedź białka G na sygnały neurotransmiterów [Chang i wsp. 2002, Avissar i wsp. 1997] oraz stwierdzono obniżony poziom cAMP [Valdizán i wsp. 2003], inozytolu [Shimon i wsp. 1997, Coupland i wsp. 2005] i CREB mierzony pośmiertnie w mózgach samobójców [Blendy 2006].

Kontrargumentami dla tej hipotezy są zarówno konieczność wielokrotnego stosowania LPD dla osiągnięcia efektu terapeutycznego w klinice [Oswald i wsp. 1972] jak i fakt, że wyczerpanie 5-HT lub NA nie wywołuje depresji u osobników zdrowych. Dodatkowym kontrargumentem jest brak działania przeciwdepresyjnego leków uwalniających monoaminy (np. amfetamina, kokaina). Co więcej wykazano również działanie przeciwdepresyjne nietypowych LPD, nie wpływających na wychwyty zwrotne monoamin

lub ich metabolizm, lecz blokujących receptory postsynaptyczne [Nowak 1997, Duman 2003].

Hipoteza zmian adaptacyjnych

Argumenty przemawiające przeciwko hipotezie monoaminergiczej, a szczególnie uwidocznienie działania przeciwdepresyjnego dopiero po 2-3 tygodniach po rozpoczęciu kuracji LPD, skłoniły badaczy do obserwacji zmian zachodzących po wielokrotnych podaniach LPD u zwierząt. Badania te wykazały, że w wyniku podań chronicznych pojawiają się różne efekty, stwierdzone farmakologicznie, biochemicznie i elektrofizjologicznie, które nie występują po podaniu jednorazowym. Zmiany te, nazwane **adaptacyjnymi lub wtórnymi**, odnoszą się często do postsynaptycznej części neuronu, podczas, gdy lek podany jednorazowo działa wyłącznie na część presynaptyczną. Istotą zjawiska adaptacji (powstawania zmian wtórnych do nagłego podwyższenia monoamin w szczelinie synaptycznej) jest zwiększanie ("**up**"- **regulacja**) lub zmniejszanie ("**down**"- **regulacja**) wrażliwości i/lub aktywności danego układu neuroprzekaźnikowego [Maj 2000, Nowak 1997, Vetulani i wsp. 2000]. Zaobserwowano:

Zmiany adaptacyjne w układzie noradrenergicznym

Chronologicznie pierwszą wykrytą zmianą adaptacyjną była **β - adrenergiczna "down"- regulacja** [Vetulani i wsp. 1975]. Efekt ten wywołuje większość LPD (TLPD, IMAO), wyjątek stanowią leki z grupy SSRI, dla których wyniki nie są jednoznaczne [Nalepa i wsp. 1993]. Jest on również charakterystyczny dla elektrowstrząsów (ECS). β - "down" - regulacja objawia się zmniejszeniem (przede wszystkim w przodomózgowie) gęstości i/lub reaktywności receptorów β - adrenergicznych i obniżeniem syntezy cAMP aktywowanej noradrenaliną lub izoprenalina i pojawia się wcześniej w korze mózgowej niż w hipokampie [Vetulani i wsp. 1975]. β - "down"- regulacja może być wykorzystywana jako **marker aktywności przeciwdepresyjnej** nowo odkrytych leków [Duncan i wsp. 1985, Leonard 1997].

Kolejną zmianą u układzie noradrenergicznym jest **α_1 - adrenergiczna "up"- regulacja** potwierdzona badaniami behawioralnymi i elektrofizjologicznymi, wywoływana przez szereg LPD (np. inhibitory wychwytu zwrotnego NA i 5-HT, citalopram, tianeptyna [Maj i wsp. 1985, Menkes i wsp. 1980, 1981], mitrazapina [Rogoz i wsp. 2002], reboksetyna [Rogoz i wsp. 2001], milnacipran [Maj i wsp. 2001] oraz ECS. Badania wtórnych przekaźników nie potwierdzają jednoznacznie "up"- regulacji na poziomie postreceptorowym.

Istnieją też dane, które świadczą o **zmniejszeniu wrażliwości receptorów α_2 adrenergicznych**, co może prowadzić do aktywacji układu noradrenergicznego [Maj i wsp. 1984, Pilc i wsp. 1982]. Uważa się, że hamujące heteroreceptory α_2 - adrenergiczne kontrolują uwalnianie serotoniny z zakończeń neuronów serotonergicznym, podczas gdy α_2 - adrenergiczne autoreceptory kontrolują uwalnianie noradrenaliny z zakończeń neuronów noradrenergicznych. Desensytyzacja tych receptorów prowadzi, zatem do zwiększenia dostępności zarówno NA jak i 5-HT w synapsie [Elwuegi 2004].

Interesująca wydaje się **interakcja między receptorami α i β** na poziomie wtórnych przekazywaczy. Udowodniono, że wielokrotne podania LPD, pomimo efektu β - "down"-regulacji, w wyniku oddziaływań między receptorami α i β mogą spowodować **nasilenie funkcji układu noradrenergicznego** [Nalepa 1994, Elwuegi 2004].

Zmiany adaptacyjne w układzie serotonergicznym

Dotychczas badano głównie wpływ LPD na receptory 5-HT₁ i 5-HT₂, a dane uzyskane z tych badań są **niejednoznaczne**. Większość LPD powoduje "**down**"- **regulację receptorów serotonergicznym 5-HT_{2A}** (TLPD, IMAO). Przeciwny wpływ na te receptory mają elektrowstrząsy. Dane dotyczące SSRI są rozbieżne. W przypadku receptora 5-HT_{1A} w badaniach radioreceptorowych zaobserwowano **zarówno wzrost, spadek, jak i brak zmian gęstości receptorów 5-HT_{1A}** po wielokrotnych podaniach LPD. Może to wynikać z braku selektywności pre- i post- synaptycznej w metodzie radioreceptorowej, co wiąże się z lokalizacją receptorów 5-HT_{1A}. Receptory 5-HT_{1A} zlokalizowane presynaptycznie funkcjonują jako somatodendryczne autoreceptory, hamując funkcję neuronów serotonergicznym. Mogą one występować również postsynaptycznie w rejonach limbicznych i korowych, gdzie nasilają aktywność serotonergiczną [Elwuegi 2004]. Większość SSRI i inhibitorów MAO zmniejsza wrażliwość somatodendrycznych receptorów 5-HT_{1A}, co skutkuje nasileniem transmisji serotonergicznym w niektórych rejonach mózgu. Mechanizmu leżącego u podstaw desensytyzacji receptorów 5-HT_{1A} upatruje się na poziomie białek G [Hensler 2002]. ECS posiadają działanie aktywujące na postsynaptyczną odpowiedź z receptorów 5-HT_{1A} [Chojnacka- Wójcik 1996, Maj i wsp. 1984, Maj 1996, Heninger i wsp. 1996, Nowak 1997, Maj 2000].

Badania *postmortem* ujawniły wyższą gęstość receptorów 5-HT_{2A} w korze przedczołowej i wyższy poziom ekspresji mRNA dla tych receptorów w korze przedczołowej i hipokampie nastoletnich [Pandey i wsp. 2002], jak i dorosłych ofiar samobójstwa [Arora

i wsp. 1989]. Potwierdza to tezę o zaburzeniu funkcji układu serotonergicznego mózgu w depresji i podczas prób samobójczych [Elwuegi 2004].

Zmiany adaptacyjne w układzie dopaminergicznym

Pomimo, iż LPD podane jednorazowo nie działają na układ dopaminergiczny, podania wielokrotne prowadzą do powstania zmian adaptacyjnych w tym układzie. Zaobserwowano wyraźną "*down*"- regulację receptorów **D₁** i "*up*"- regulację receptorów **D₂**, zarówno po LPD jak i ECS, zachodzące głównie w strukturach układu limbicznego. "*Down*"- regulacja receptorów **D₁** wiąże się ze spadkiem gęstości tych receptorów, natomiast "*up*"- regulacja receptorów **D₂** ze wzrostem powinowactwa agonisty do tych receptorów. Zmiany te zostały potwierdzone w badaniach behawioralnych. Sugeruje się również "*up*"- regulację receptorów **D₃** [Maj i wsp. 1984, Maj 1996, Maj 2000, Nowak 1997, Henninger i wsp. 1996].

Hipoteza przewlekłego stresu

Według tej hipotezy za główną przyczynę depresji uznaje się stres, który powoduje powstanie zmian patologicznych w mózgu [Tafet i wsp 2003, 2004]. W odpowiedzi na stres dochodzi do **wzmoczonej aktywacji osi podwzgórze - przysadka - nadnercza** (HPA). Czynniki stresowe odbierane przez korę mózgową wpływają na podwzgórze pobudzając neurony jądra przykomorowego do wydzielania kortykoliberyny (CRF), która stymuluje syntezę i uwalnianie adrenokortykotropiny (ACTH) przez komórki przysadki. ACTH stymuluje z kolei komórki kory nadnerczy do syntezy i uwalniania glukokortykoidów, w tym kortyzolu, uznawanego za główny "hormon stresu". W mechanizmie sprzężenia zwrotnego dochodzi do zahamowania uwalniania CRF. W przypadku nadmiernej aktywacji osi HPA, glukokortykoidy powodują, między innymi, **uszkodzenie neuronów hipokampa i kory czołowej**, a więc struktur odpowiedzialnych za powstawanie reakcji emocjonalnych. Szczególne znaczenie ma uszkodzenie neuronów hipokampa, ponieważ w dużej mierze kontrolują one aktywność osi HPA wywierając efekt hamujący. Zaburzenie systemu sprzężeń zwrotnych dodatkowo nasila aktywność osi HPA, a zwiększony poziom glukokortykoidów działa uszkadzająco na neurony glutaminianergiczne, serotonergiczne i dopaminergiczne, redukuje rozgałęzienie dendrytów, zmniejsza ilość kolców dendrytycznych, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia objętości hipokampa i kory czołowej, charakterystycznego dla pacjentów z ciężką depresją [Nestler i wsp. 2002, Bremner i wsp. 2002, Sapolsky i wsp. 2000,

Sheline i wsp. 1999, Pałucha i wsp. 2005]. Podwyższony poziom glukokortykoidów może zahamować również neurogenezę, co wiąże się ze **zmniejszoną objętością hipokampa**, widoczną w obrazach uzyskanych techniką rezonansu magnetycznego u licznych pacjentów chorych na depresję [MacQueen i wsp. 2003, Bremner 2006].

Istnieje wiele dowodów potwierdzających udział kortyzolu i CRF w patomechanizmie depresji [Merali i wsp. 2004, MacMaster i wsp. 2006]. U pacjentów z depresją często występuje podniesiony poziom kortyzolu w osoczu, CRF w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz zwiększona ilość mRNA i białka dla CRF w układzie limbicznym [Merali i wsp. 2004]. W badaniach z użyciem deksametazonu u prawie połowy pacjentów z ciężką depresją nie występuje normalna reakcja odpowiedzi na kortyzol, natomiast skutecznej terapii przeciwdepresyjnej towarzyszy poprawa tych nieprawidłowości [Carrol i wsp. 2007]. Potwierdzeniem roli stresu w patofizjologii depresji są badania wskazujące, że ekspozycja na długotrwały stres we wczesnym dzieciństwie często prowadzi do trwałych uszkodzeń osi HPA, z nadmiernym wydzielaniem kortyzolu, owocująca depresją w dorosłym życiu [Arborelius i wsp. 1999]. Dodatkowym dowodem jest zwiększony poziom CRF w płynie mózgowo-rdzeniowym u osób dorosłych, wykorzystywanych fizycznie lub seksualnie jako dzieci [Lee i wsp. 2005].

Obecnie jedną z najintensywniej badanych grup potencjalnych antydepresantów są **antagoniści receptorów glukokortykoidowych** (np. mifepriston) [Belanoff i wsp. 2002] oraz **antagoniści receptorów CRF** (np. antagonist receptor CRF₁-NBI-30775/R121919) [Ising i wsp. 2007, Holsboer i wsp. 2008]. Ponieważ związki te są aktywne w badaniach klinicznych, jak również nie wykazują istotnych działań niepożądanych wydają się być bardzo obiecujące.

Hipoteza troficzna

Patologiczny wpływ stresu na hipokamp odnosi się również do hipotezy, w której proponuje się udział **czynników neurotroficznych** takich jak: **NGF** (ang. *nerve growth factor*), **BDNF** (ang. *brain derived neurotrophic factor*) i **NT3** (ang. *neurotrophin-3*) w etiologii depresji i jej leczeniu [Duman i wsp. 1997, Altar 1999]. Neurotroficzna hipoteza depresji zakłada, że **niedobór neurotrofin przyczynia się do rozwoju patologii hipokampa w depresji**, a uzupełnienie tego deficytu przez leki przeciwdepresyjne odwraca symptomy choroby [Duman 2004a, Duman 2005].

Badania nad czynnikami neurotropowymi skoncentrowały się na jednym z najbardziej rozpowszechnionych w dojrzałym mózgu - **mózgowym czynnikiem neurotroficznym BDNF**. Peptyd ten ma kluczowe znaczenie dla wzrostu aksonalnego, decyduje o przeżyciu neuronów oraz uczestniczy w procesach plastyczności synaptycznej [Heldt i wsp. 2007]. Udowodniono, że ekspresja BDNF w obszarze CA3 hipokampa zmniejsza się pod wpływem stresu i działania glukokortykoidów (kortyzolu) [Smith i wsp. 1995, Kozlovsky i wsp. 2007, Angelucci i wsp. 2005]. W badaniach *postmortem* u pacjentów z depresją, których śmierć była wynikiem samobójstwa, wykazano zredukowany poziom BDNF w hipokampie [Karege i wsp. 2005]. Natomiast chroniczne, lecz nie ostre podania LPD zwiększają poziom BDNF w hipokampie u ludzi [Chen i wsp. 2001]. W antydepresyjnej indukcji BDNF przynajmniej częściowo pośredniczy **czynnik transkrypcyjny CREB** (ang. *cAMP response element binding protein*). Wpływ CREB na wzrost poziomu BDNF stwierdzono zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [Conti i wsp. 2002, Finkbeiner i wsp. 1997]. Wykazano również, że LPD wywołują wzrost poziomu CREB w korze mózgowej, hipokampie i jądrze migdałowatym [Thome i wsp. 2000, Nibuya i wsp. 1996], co wiąże się prawdopodobnie z podwyższoną aktywacją szlaku przekazywania sygnału związanego z cAMP [Nestler i wsp. 1989].

Sugeruje się, że LPD, które wpływają na podniesienie poziomu BDNF uruchamiają system naprawczy w obrębie neuronów uszkodzonych w wyniku długotrwałego stresu i chronią przed dalszym uszkodzeniem. **BDNF stanowi zatem połączenie pomiędzy stresem, neurogenezą i atrofią hipokampa w depresji**. Może on być również związany z innymi schorzeniami psychiatrycznymi [Angelucci i wsp. 2005]. Dodatkowo, od czasu, kiedy pojawiły się doniesienia, że BDNF ułatwia potencjalizację długoterminową LTP (ang. *long-term potentiation*) i inne formy plastyczności synaptycznej w hipokampie [Korte i wsp. 1996] okazało się, że zwiększony poziom BDNF może pobudzać funkcje hipokampa. W ten sposób można również wyjaśnić opóźnioną odpowiedź na LPD: czas opóźnienia jest niezbędny dla osiągnięcia takiego wzrostu poziomu BDNF, który wyzwoli efekty neurotroficzne [Nestler i wsp. 2002].

Różne dane epidemiologiczne świadczą też o związku pomiędzy dużą depresją, a zwiększoną zachorowalnością i śmiertelnością naczyniowo - sercową [Lespérance i wsp. 2007]. Przekazywanie sygnału z komórek śródbłonna odgrywa kluczową rolę w procesie neurogenezy. Biorąc pod uwagę, że komórki endotelialne wydzielają BDNF, zarówno depresja, jak i choroby sercowo - naczyniowe mogą być przykładami zaburzeń endotelialnych [Warner- Schmidt i wsp. 2007, Müller i wsp. 2006].

Kolejne doniesienia podkreślają też wpływ ćwiczeń fizycznych i odpowiedniej diety na zwiększenie ekspresji BDNF i procesu neurogenezy, który wydaje się być podobny do leczenia przeciwdepresyjnego [Russo - Neustadt i wsp. 2004, Lee i wsp. 2002, Duman 2005].

Hipoteza troficzna nie przyniosła efektów w postaci nowych LPD, ale znacznie poszerzyła wiedzę na temat mechanizmu działania LPD oraz roli czynników troficznych w neurogenezie [Belmaker i wsp. 2008, Nowakowska i wsp. 2005].

Hipoteza zaburzeń neuroplastyczności oraz hipoteza sieci neuronalnej

Zgodnie z **hipotezą zaburzeń neuroplastyczności** (strukturalnej plastyczności mózgu, zdolności do zmian i reagowania na wyzwania ze strony środowiska), depresja powstaje w wyniku zmian neuroplastyczności różnorodnych obszarów mózgu związanych z kontrolą nastroju. Potwierdzają to badania na zwierzętach poddanych działaniu silnych bodźców emocjonalnych oraz badania *postmortem* na mózgach chorych na depresję, w których zaobserwowano:

- osłabienie neurogenezy w hipokampie, w wieku dorosłym
- zmniejszenie gęstości komórek glejowych i rozmiarów neuronów w korze przedczołowej, demielinizację, utratę aksonów oraz oznaki martwicy neuronów
- wzmożenie przekaźnictwa synaptycznego [Duman 2004b].

Efekty te mogą wpływać na zmiany morfologiczne omówione poniżej.

Badania morfometryczne z użyciem jądrowego rezonansu magnetycznego u pacjentów z zaburzeniami afektywnymi oraz badania *postmortem* wykazały, że długotrwałe występowanie zaburzeń nastroju wiąże się z istotnymi nieprawidłowościami anatomicznymi w porównaniu z osobami zdrowymi z grupy kontrolnej, takimi jak:

- zmniejszenie objętości istoty szarej w przyśrodkowej i oczodołowej części kory przedczołowej
- zanik (atrofia) hipokampa oraz brzusznej części prążkowiec
- poszerzenie komory trzeciej

Zanotowano również zwiększony przepływ krwi w obszarze jądra migdałowatego, mierzony za pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej, który korelował z nasileniem objawów depresji [Vincent 2004].

Postępy neurobiologii umożliwiły poznanie wielopoziomowego wpływu LPD na czynność neuronów docelowych poza synapsą i receptorami monoamin. Do najważniejszych adaptacji wywołanych leczeniem przeciwdepresyjnym opartych na mechanizmie neuroplastyczności należą: aktywacja kaskady cAMP, wzrost czynników neurotroficznycch oraz nasilenie procesu neurogenezy [Duman 2004b].

Teoria sieci neuronalnych, ściśle wiąże się z pojęciem neuroplastyczności. Według niej zaburzeniom nastroju, w tym depresji, towarzyszy nieprawidłowe funkcjonowanie **krytycznych sieci neuronalnych**, podczas gdy stopniowa naprawa tych sieci, poprzez zależną od aktywności plastyczność neuronalną, przynosi efekt przeciwdepresyjny [Castrén i wsp. 2007, Kozisek i wsp. 2008]. Krytyczne sieci neuronalne obejmują określone szlaki neuroanatomiczne: szlak limbiczno- wzgórzowo- korowy oraz szlak limbiczno- prążkowiowo- gałkowo- wzgórzowy. Tworzą one obwód z wzajemnymi połączeniami z obszarami mózgu, w których występuje utrata objętości [Sheline 2004]. Czynniki neurotropowe same w sobie nie kontrolują nastroju, lecz służą jako niezbędne narzędzia w zależnej od aktywności modulacji sieci, której fizjologiczne funkcjonowanie determinuje wpływ zmian plastycznych na nastrój [Castrén i wsp. 2007, Kozisek i wsp. 2008]. LPD mogą lokalnie nasilać aktywność neuronalną, która reguluje uwalnianie czynników neurotroficznycch sterujących procesami plastyczności neuronalnej, włączając neurogenezę, synaptogenezę i dojrzewanie neuronów w rejonach mózgu narażonych na czynniki neurotoksyczne. Mechanizm działania LPD sprowadza się, zatem do odbudowy funkcjonalnej sieci neuronalnej w określonych obszarach mózgu [Castrén 2005, Castrén i wsp. 2007]. Potwierdzają to badania, w których wykazano, że LPD i elektrowstrząsy pobudzają procesy neurogenezy w hipokampie osób dorosłych [Malberg 2004, Schmidt i wsp. 2007]. Hipoteza ta wyjaśnia opóźnienie efektu działania LPD, opierając ich mechanizm działania na procesach plastyczności neuronalnej [D`Sa i wsp. 2002, Duman 2004b].

ROLA UKŁADU GLUTAMINIANERGICZNEGO W PATOMECHANIZMIE DEPRESJI

Odkrycie zmian adaptacyjnych doprowadziło do zmiany kierunku badań nad patofizjologią depresji z teorii zakładającej deficyt monoamin do hipotezy, której podstawą jest zmiana wrażliwości, czy reaktywności receptorów. Natomiast niespójność wyników zmian adaptacyjnych w układach monoamin skierowała uwagę badaczy na inne systemy neurotransmisyjne.

Budowa i funkcja układu glutaminianergicznego

W ośrodkowym układzie nerwowym dynamicznie równoważą się dwa systemy kontrolujące homeostazę: pobudzający glutaminianergiczny i hamujący GABA-ergiczny. W zależności od okolicy i warstwy kory mózgowej, neurony glutaminianergiczne stanowią od kilku do 50% wszystkich komórek nerwowych. Uwalniany w wyniku depolaryzacji główny i wszechobecny przekaźnik pobudzający- kwas glutaminowy- oddziałuje z receptorami glutaminianergicznymi należącymi do dwóch rodzin. Pierwsza z nich to rodzina **receptorów jonotropowych**, związanych z kanałem jonowym, reprezentowana przez receptory typu: NMDA, AMPA i kainianowe, mające udział w szybkim przekaźnictwie synaptycznym. Drugą rodzinę stanowią **receptory metabotropowe** (mGluR) związane z białkiem G [Rang i wsp. 1999, Nowak i wsp. 2001, Danysz i wsp. 2004, Nowakowska i wsp. 2005].

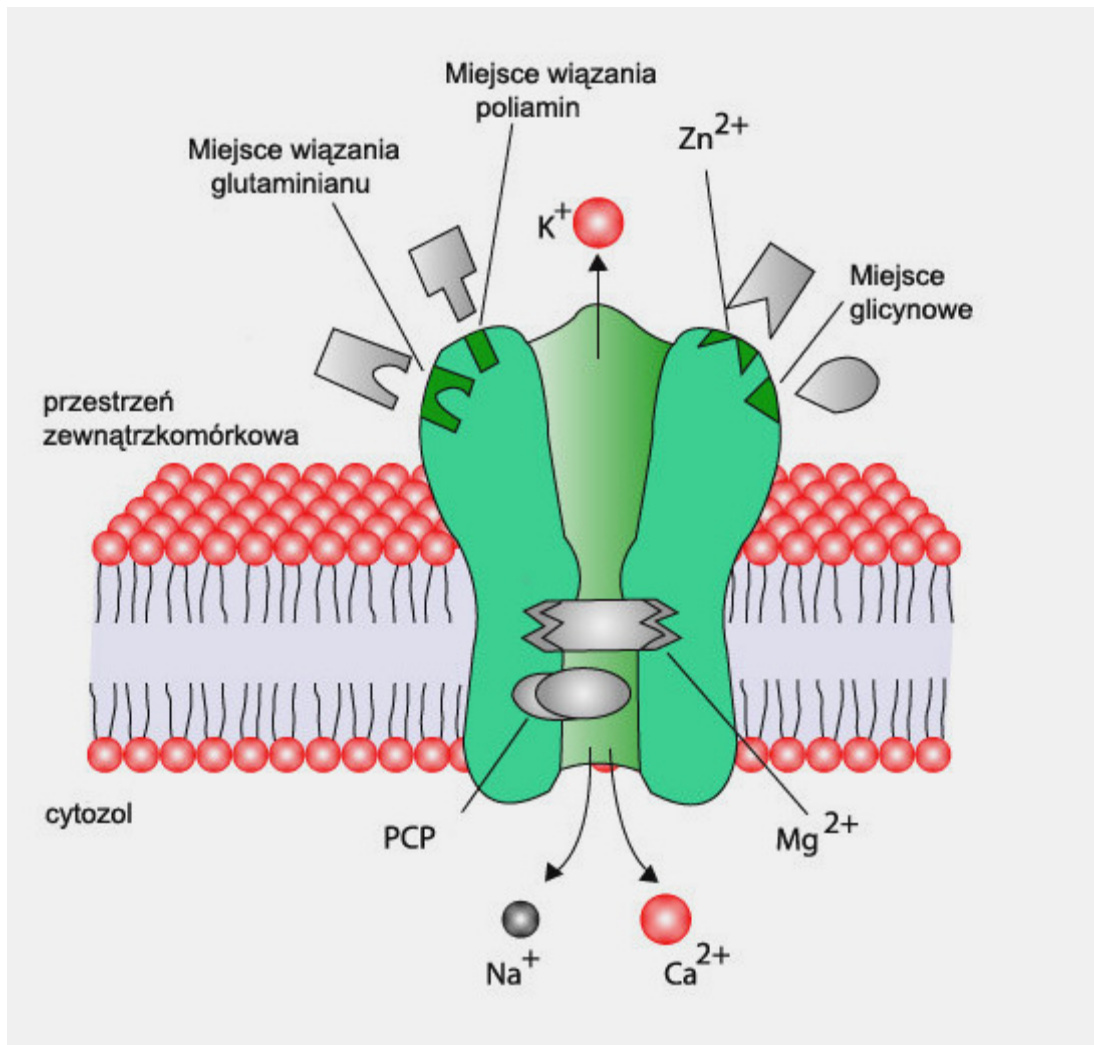
Jonotropowe receptory glutaminianergiczne

Receptory NMDA

Receptory NMDA (dla kwasu N- metylo- D- asparaginowego) są szeroko rozpowszechnione w o.u.n., a szczególnie obficie występują w hipokampie (obszar CA1), korze mózgowej, jądrach podstawy, przegrodzie i jądrze migdałowatym, gdzie lokalizują się głównie postsynaptycznie. Charakteryzuje je duża przewodność (ok. 50 pS)

i powiązanie z kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla jonów Ca^{2+} , Na^+ i K^+ [Danysz i wsp. 2004, Longstaff i wsp. 2000].

Receptory NMDA składają się z podjednostek należących do trzech rodzin genów (NR1-3). Wszystkie receptory tego typu zbudowane są z **podjednostki NR1**, która spełnia dwie funkcje: zawiera miejsce wiążące dla glicyny oraz jest niezbędna w zakotwiczeniu heteromerycznego receptora w błonie komórkowej. Podjednostka NR1 połączona jest z **podjednostką NR2** (reprezentowaną przez cztery geny: NR2 A, B, C, D), która posiada miejsca wiążące dla glutaminianu, rzadziej z **podjednostką NR3 A/B**, która również zawiera miejsca wiążące dla glicyny, odległe od miejsc znajdujących się na podjednostce NR1 [Mayer i wsp. 2004]. Receptor NMDA ma najczęściej budowę tetrameryczną będącą kombinacją dwóch typów podjednostek NR1 i dwóch NR2. Podjednostka NR2B dominuje nad innymi formami [Danysz i wsp. 2004].



Ryc. 1. Schemat budowy receptora NMDA [z Danysz i wsp. 2004].

Sposób pobudzenia receptora NMDA jest stosunkowo złożony, a do pełnej aktywacji dochodzi w wyniku serii wyładowań zsynchronizowanych czasoprzestrzennie [Danysz i wsp. 2004]. Głównym **agonistą endogennym, jest kwas glutaminowy**, ale funkcję tę mogą pełnić również kwasy: asparaginowy, chinolinowy, L-homocysteinowy lub agonista egzogenny, którym jest kwas **NMDA**. Warunkiem niezbędnym do aktywacji receptora jest przyłączenie **koagonisty- glicyny**, która wiąże się z receptorem w miejscu oznaczonym jako GLY_B (miejsce glicynowe niewrażliwe na strychninę). Konieczne jest przyłączenie aż dwóch cząsteczek glutaminianu, po jednej do każdej z podjednostek NR2 oraz dwóch cząsteczek glicyny, po jednej do każdej z podjednostek NR1 [Danysz i wsp.2004, Rang i wsp.1999]. Stymulacja znajdującego się zewnątrzkomórkowo miejsca GLY_B jest niezbędna do otwarcia kanału jonowego, nawet przy dużych stężeniach agonisty NMDA [Pałucha i wsp. 2001]. Dodatkowo kanał jonowy receptora blokowany jest przez **jon magnezowy** i dopiero odpowiednio duża depolaryzacja błony komórkowej (np. podczas przedłużonej aktywacji receptorów AMPA) znosi blokadę magnezową umożliwiając dokomórkowy napływ jonów **Na⁺ i Ca²⁺**. Jony wapnia uruchamiają kaskadę zdarzeń, która może prowadzić do zmian czynnościowych synapsy, co sugeruje udział receptora NMDA w procesach **plastyczności synaptycznej, uczeniu się, pamięci i adaptacji** [Danysz i wsp. 2004, Rang i wsp.1999]. W warunkach fizjologicznych poza szybką transmisją synaptyczną receptor ten bierze udział w regulacji i kontroli czynności oddechowej, przekazywaniu impulsów wzrokowych, przewodzeniu czucia bólu, powstawaniu lęku i formowaniu reakcji awersyjnych [Siwek i wsp. 2005]. Receptory NMDA jak i metabotropowe receptory dla glutaminianu zaangażowane są również w procesy patofizjologiczne takie jak **ekscytotoksyczność** oraz powstawanie **padaczki i udarów** [Rang i wsp. 1999, Longstaff i wsp. 2000].

Wiele substancji, działających w miejscach innych niż miejsca wiązania dla glutaminianu może wpływać modulująco na kompleks receptora NMDA [Danysz i wsp. 2004, Rang i wsp. 1999]. Do modulatorów tych należą **poliaminy** (spermina, spermidyna- pozytywny wpływ modulujący) [Danysz i wsp. 2004, Rang i wsp.1999 Longstaff i wsp. 2000, Pałucha i wsp. 2001], **ligandy sigma, histamina, hormony steroidowe** [Danysz i wsp. 2004]. Receptory NMDA są także wrażliwe na zmiany **potencjału oksydoredukcyjnego** (substancje utleniające hamują, a redukujące nasilają funkcję receptora) oraz **wartości pH** środowiska (obniżenie wartości pH poniżej poziomu fizjologicznego (7,4) powoduje zahamowanie funkcji receptora, jej podwyższenie nasila aktywację). Kolejnym miejscem modulującym jest leżące wewnątrz kanału receptora

NMDA miejsce wiążące **fencyklidynę** (PCP). PCP spełnia rolę bezkompetycyjnego antagonisty, uzyskując dostęp do swojego miejsca rozpoznawczego dopiero przy otwartym kanale (aktywacja receptora). Miejsce PCP stanowi istotny punkt uchwytu substancji blokujących kanał NMDA w sposób bezkompetycyjny takich jak MK-801, memantyna, ketamina, dekstrorfan, amantadyna [Danysz i wsp. 2004, Pałucha i wsp. 2001].

Modulacja przez jony cynku

Istotnym czynnikiem modulującym funkcję receptora NMDA są jony cynku [Danysz 2004]. Cynk jest antagonistą receptora NMDA, o miejscu wiązania innym niż dla jonów magnezu [Christine i wsp. 1990, Paoletti i wsp. 1997]. Stężenie jonów cynku w mózgu ($1\mu\text{M}$) jest wystarczające do interakcji z receptorem NMDA. Biometal ten jest również uwalniany z zakończeń glutaminianergicznych wraz z glutaminianem [Assaf i wsp. 1984]. W 1987 roku odkryto, że **cynk hamuje funkcję receptora NMDA** [Peters i wsp. 1987, Westbrook i wsp. 1987]. Badania sugerują, że cynk uwalniany z zakończeń włókien mszystych umożliwia toniczne zablokowanie receptora NMDA w synapsach neuronów piramidowych pola CA3 hipokampa [Vogt i wsp. 2000]. Badania elektrofizjologiczne na hodowlach neuronalnych wykazały, że Zn^{2+} hamuje aktywację receptora NMDA w dwóch, oddzielnych mechanizmach. Niezależnie od napięcia, w stężeniach do $10\mu\text{M}$, cynk działa poprzez miejsce wiążące znajdujące się na zewnątrz kanału receptora, gdzie na drodze **allosterycznej interakcji z miejscem GLY_B prowadzi do obniżenia powinowactwa glicyny do miejsca glicynowego**. Za efekt ten odpowiada zewnątrzkomórkowa N-końcowa domena na podjednostkach NR1 lub NR2, która determinuje allosteryczną inhibicję receptora [Madry i wsp. 2007]. W stężeniach wyższych (mM), cynk **blokuje bezpośrednio kanał jonowy receptora**, a efekt ten zależy od potencjału błonowego [Smart i wsp. 1994, Pałucha i wsp. 2001, Danysz i wsp. 2004, Frederickson i wsp. 2005]. Poszczególne podtypy receptora NMDA, w zależności od kombinacji podjednostek cechuje różna wrażliwość na jony cynku. Rekombinowane receptory zbudowane z podjednostek NR1/NR2B są blokowane przez niskie, mikromolarne stężenia cynku, natomiast receptory zawierające podjednostki NR1/NR2A posiadają miejsca o wysokim i niskim powinowactwie dla cynku. Blokada receptorów w miejscu o wysokim powinowactwie pojawia się już przy niskich stężeniach nanomolarnych (IC_{50} 0.005-0.08 μM), podczas gdy inhibicja w miejscu o niższym powinowactwie (IC_{50} 26-79 μM) wymaga stężeń w przedziale 30-100 μM . Receptory triheteromeryczne o ekspresji podjednostek: NR1/NR2A/NR2B pozostają wysoce wrażliwe na cynk, ale efektywność ich

hamowania przez cynk pozostaje mniejsza w porównaniu z diheteromerami [Paoletti i wsp. 1997, Izumi i wsp. 2006].

Szczególnie interesujące wydaje się **miejsce o wysokim powinowactwie** (IC_{50} w przedziale nM) w obrębie podjednostki **NR2A**, ponieważ w zdrowym mózgu stężenie wolnych jonów cynku mieści się właśnie pomiędzy 1 nM a 10 nM. Oznacza to, że miejsce to jest normalnie częściowo okupowane przez cynk, a w ten sposób kanał receptora NMDA jest odpowiednio przyhamowany. Potwierdzają to badania niektórych naukowców z użyciem chelatorów cynku, obniżających jego stężenie poniżej 0.1 nM. Zwiększa się, wówczas amplituda przesyłanych przez NMDA odpowiedzi postsynaptycznych [Frederickson i wsp. 2005, Izumi i wsp. 2006]. Z kolei wyniki badań grupy Erregera wskazują na fakt, że nie tylko stężenie, lecz również przebieg czasowy uwalniania zarówno jonów cynku jak i glutaminianu są czynnikami krytycznymi w determinowaniu wpływu cynku na receptor NMDA. Sugeruje on, że receptor NMDA o budowie: NR1/NR2A jest wrażliwy na nanomolarne stężenia cynku, ale tylko pod warunkiem zachowania stanu równowagi Zn^{2+} lub aktywności o wysokiej częstotliwości. Natomiast uwalnianie cynku z glutaminianem przy niskiej częstotliwości miałoby minimalny wpływ na prądy synaptyczne przesyłane przy udziale receptora NR1/NR2A NMDA, chociaż synaptycznie uwalniany cynk mógłby być istotnym czynnikiem w osiągnięciu stanu równowagi [Erreger i wsp. 2005].

Efekt hamujący cynku na podjednostkę NR2A wykazuje synergizm działania z hamującym efektem protonów. Maksymalne zahamowanie receptora NMDA pojawia się, gdy równolegle obniża się na zewnątrz komórki zarówno pH i pZn^{2+} [Low i wsp. 2000, Frederickson i wsp. 2005, Erreger i wsp. 2008]. Sugeruje się nawet, że wiązanie cynku do receptora powoduje zwiększenie wrażliwości na protony, którego rezultatem jest wzrost inhibicji receptorów NMDA związanych z cynkiem przez fizjologiczne stężenia protonów [Erreger i wsp. 2008].

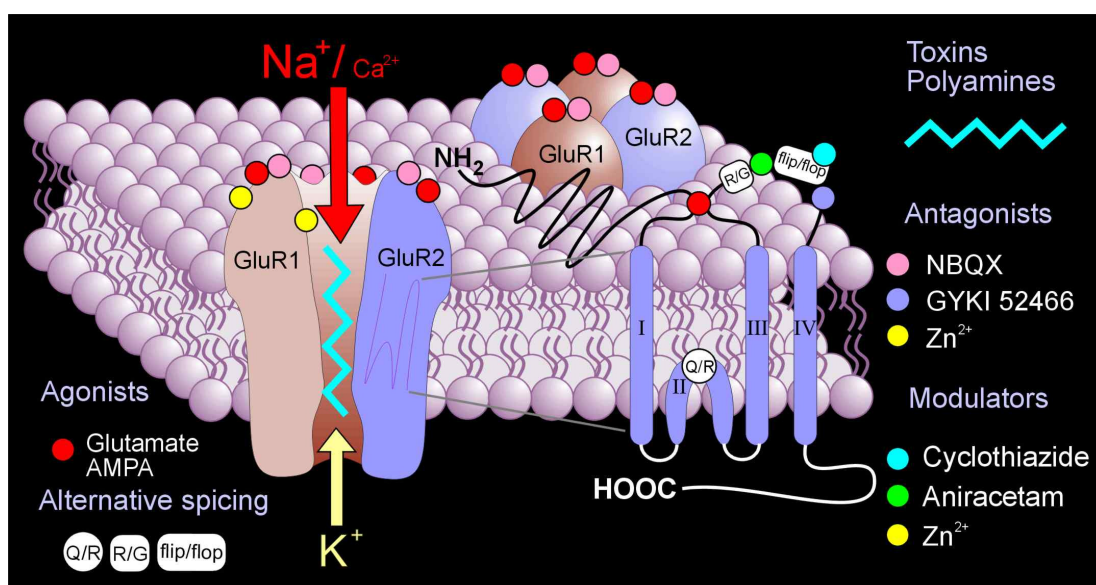
Cynk powoduje również paradoksalnie opóźnienie wzrostu wrażliwości receptora NMDA na agonistów. Ten efekt opóźnienia związany jest ze zwiększoną fosforyzacją tyrozyny podjednostek NR2A i NR2B, co obniża ich wrażliwość na toniczną inhibicję za pośrednictwem cynku [Kim i wsp. 2002, Frederickson i wsp. 2005].

Interesujący wydaje się fakt, że wejścia zawierające cynk preferencyjnie unerwiają miejsca postsynaptyczne z receptorami NMDA w stosunku do miejsc z receptorami AMPA czy kainianowymi. Oznacza to, że regulacja „w dół” receptora NMDA przez cynk bazuje na

lokalnym uwalnianiu cynku z bezpośrednio przyległych zakończeń synaptycznych [Sindreu i wsp. 2003].

Receptory nie- NMDA: AMPA, Kainianowe

Receptory AMPA, związane z kanałem jonowym przepuszczalnym głównie dla Na^+ i K^+ , są tetramerycznymi kompleksami stanowiącymi kombinację dwóch lub więcej typów podjednostek: **GluR1**, **GluR2**, **GluR3**, **GluR4**. W dojrzałych synapsach dochodzi do koekspresji receptorów AMPA z receptorami NMDA, gdzie w duecie uczestniczą one w zjawiskach plastyczności synaptycznej [Danysz i wsp. 2004, Maeng i wsp. 2007]. Podobnie jak w przypadku receptora NMDA teoretyczna możliwość kompozycji podjednostek AMPA jest ogromna. Receptory AMPA wykazują mniejsze powinowactwo do kwasu glutaminowego niż receptory NMDA, a ich aktywacja jest szybsza, dlatego uważa się, że mają one **podstawowe znaczenie w szybkim przekazywaniu synaptycznym** układu glutaminianergicznego. Cechą charakterystyczną tych receptorów jest szybko pojawiająca się desensytyzacja reakcji na agonistę [Danysz i wsp. 2004]. Aktywacja receptora AMPA otwiera kanały pozwalając na napływ jonów sodu do wnętrza komórki, co powoduje depolaryzację błony komórkowej. Ta zmiana ładunków znosi blokadę magnezową z kanału jonowego receptora NMDA umożliwiając tym samym napływ jonów wapnia przez kanał receptora NMDA [Maeng i wsp. 2007].



Ryc. 2. Schemat budowy receptora AMPA [z 4].

Modulacja przez jony cynku

Jednym z modulatorów receptora AMPA jest cynk. W małych stężeniach, około 30 μM **wzmaga on odpowiedzi mediowane przez AMPA**, co powoduje przesunięcie równowagi pobudzenia w układzie glutaminianergicznym, związanego z aktywacją receptorów NMDA, na korzyść receptorów AMPA i/lub kainianowych [Smart i wsp. 1994]. Aktywowanie receptorów AMPA zaobserwowano w oocytach *Xenopus* [Rassender i wsp. 1990] oraz w skrawkach kory gruszkowatej [Hori i wsp. 1987]. W stężeniach większych (mM), cynk **hamuje receptor AMPA** poprzez bezpośrednią blokadę kanału jonowego. W niektórych regionach mózgu (np. region CA1 hipokampa) pobudzenie receptora AMPA jest z kolei niezbędne do zainicjowania aktywacji receptora NMDA [Smart i wsp. 1994, Danysz i wsp. 2004]. W komórkach siatkówki oka cynk osłabia wpływ glutaminianu na receptor AMPA, co w warunkach patologicznych może chronić te komórki przed ekscytotoksyczną neurodegeneracją [Zhang i wsp. 2002].

Wysunięto hipotezę, że cynk może wzmacniać prądy mediowane przez receptor AMPA poprzez zmniejszanie desensytyzacji receptora AMPA. Modulacja funkcji receptora odbywa się poprzez miejsca wiążące dla cynku. Scharakteryzowano **pięć miejsc wiążących cynk** bogatych w histydynę w rejonie S1/S2 AMPA i odkryto, że niektóre z nich nie występują na wszystkich podjednostkach, w szczególności His- 412, która jest obecna na podjednostkach GluR2-4, a nie występuje w GluR1. Różnica w kompozycji podjednostek receptora AMPA ma więc znaczenie w określaniu wrażliwości na jony cynku, jak również wrażliwość ta zależy od występowania formy receptora "flip" lub "flop" [Shen i wsp. 1999].

Receptory kainianowe stanowią najpóźniej odkrytą i najslabiej poznaną grupę receptorów jonotropowych dla glutaminianu. Dotychczas zidentyfikowano pięć podjednostek receptora kainianowego: **GluR5, GluR6, GluR7** oraz **KA1 i KA2** [Danysz i wsp. 2004]. Podczas, gdy receptory NMDA i AMPA współwystępują obok siebie, receptory kainianowe rozmieszczone są bardziej restrykcyjnie [Rang i wsp. 1999].

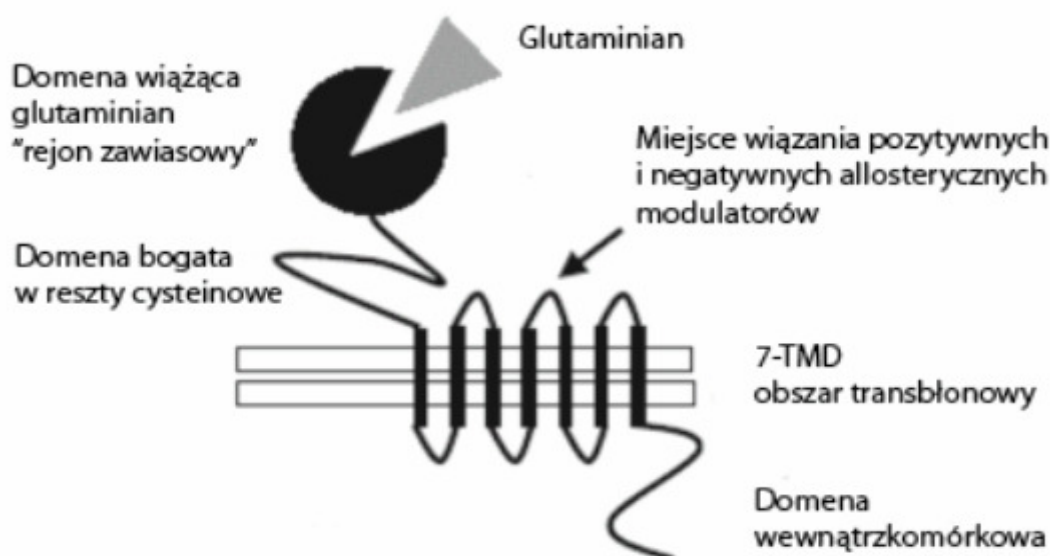
Modulacja przez jony cynku

Dane dotyczące wpływu cynku na receptory kainianowe są sprzeczne. Wstępne badania wykazały, że cynk w ilościach mikromolarnych praktycznie nie zmienia odpowiedzi receptorów kainianowych, natomiast przy stężeniu 1mM słabo je hamuje [Peters i wsp. 1987, Westbrook i wsp. 1987]. Natomiast wyniki ostatnich eksperymentów dowodzą, że cynk hamuje aktywność receptorów kainianowych już w niskich stężeniach,

w sposób zależny od pH i niezależnie od napięcia, proporcjonalnie do stężenia [Mott i wsp. 2008, Nakashima i wsp. 2009].

Receptory metabotropowe

Glutaminianergiczne receptory metabotropowe (mGluR) **związane są z białkami G** i modulują metabolizm fosfatydyloinozytolu oraz poziom cAMP zarówno pre- jak i postsynaptycznie [Rang i wsp. 1999, Danysz i wsp. 2004, Longstaff i wsp. 2000]. Mają one siedem segmentów transbłonowych (TMI-TMVII). Trzecia pętla cytoplazmatyczna, położona pomiędzy segmentami V i VI wchodzi w interakcję z białkiem G. Rodzinę receptorów metabotropowych charakteryzuje obecność długiego końca N, zawierającego miejsce wiążące glutaminian [Longstaff i wsp. 2000, Zawilska i wsp. 2004]. Dotychczas sklonowano i scharakteryzowano osiem typów receptorów mGluR: **mGluR1 - mGluR8**. Receptor mGluR1 występuje w czterech odmianach (*splice variants*): a, b, c i d, receptory mGluR5, mGluR7 i mGluR8 w dwóch: a i b [Pałucha i wsp. 2005].



Ryc. 3. Schemat budowy receptora metabotropowego dla glutaminianu.

Na podstawie wzajemnego podobieństwa sekwencji aminokwasowych, profilu farmakologicznego oraz związku z danym układem drugich przekaźników receptory mGluR zostały podzielone na trzy grupy:

- **grupa I:** receptory **mGluR1 i mGluR5**, związane ze szlakiem fosfolipazy C (PLC), zlokalizowane głównie postsynaptycznie, poza aktywnym centrum synapsy, w obszarach mózgu związanych z zaburzeniami nastroju; ich aktywacja wywołuje pobudzający efekt synaptyczny, który prowadzi m.in. do pobudzenia receptora NMDA
- **grupa II:** receptory **mGluR2 i mGluR3**, negatywnie związane z cyklazą adenylową (AC), zlokalizowane presynaptycznie, na obrzeżach synapsy, lub nawet poza nią; sugeruje się, że stymulacja receptora mGluR2 hamuje uwalnianie GABA w mechanizmie presynaptycznym
- **grupy III** receptory **mGluR4, mGluR6, mGluR7 i mGluR8**, również negatywnie związane z cyklazą adenylową (AC), zlokalizowane presynaptycznie w okolicy centrum aktywnego synapsy zarówno na neuronach jak i komórkach glejowych; kontrolują synaptyczną dostępność glutaminianu, ale też GABA, dopaminy i serotoniny [Danysz, i wsp. 2004, Pałucha i wsp. 2005, Pilc i wsp. 2008].

Metabotropowe receptory glutaminianergiczne modulują szybką transmisję synaptyczną związaną z kanałami jonowymi. Aktywacja danego układu przekaźników drugiego rzędu lub bezpośrednia fosforylacja białek receptorów jonotropowych może mieć skutki zarówno pobudzające jak i hamujące, w zależności od tego, jaki wewnątrzkomórkowy typ układów efektorowych jest aktywowany [Danysz i wsp. 2004]. Receptory z tej rodziny uczestniczą w wywoływanej przez glutaminian plastyczności synaptycznej i ekscytotoksyczności [Rang i wsp. 1999, Danysz i wsp. 2004]. Pełnią istotną rolę w trakcie rozwoju ontogenetycznego ośrodkowego układu nerwowego [Danysz i wsp. 2004].

Modulacja przez jony cynku

Cynk **zmniejsza odpowiedzi postsynaptyczne zachodzące z udziałem receptorów metabotropowych** dla glutaminianu [Xie i wsp. 1993]. W stężeniach pomiędzy 10-30 μM osłabia reakcję receptorów mGluR grupy I na agonistów, mierzoną poziomem akumulacji IP3 w skrawkach mózgu, zmniejszając w ten sposób aktywację kompleksu NMDA [Pałucha i wsp. 2001]. Wyniki badań grupy Zirpela wykazały, że cynk działając na grupę I receptorów mGluR, hamuje uwalnianie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych neuronów słuchowych jądra wielkokomórkowego (*nucleus magnocellularis*) i zaburza zależną od aktywności homeostazę wapnia w sposób identyczny, jak czyni to specyficzny antagonistą mGluR5- **MPEP** ((2-metylo-6-(fenyletynylo)-pirydyna)) [Zirpel i wsp. 2001].

Układ glutaminianergiczny w patofizjologii i leczeniu depresji

Hipoteza glutaminianergiczna

Układ glutaminianergiczny, a szczególnie **nadmierna aktywacja receptora NMDA może odgrywać istotną rolę w patogenezie depresji** [Toru i wsp. 1994, Płaźnik i wsp. 1996]. Pierwsze prace, które zwróciły uwagę badaczy na układ glutaminianergiczny, wykazały, że u pacjentów z depresją poziom glutaminianu w surowicy i płytkach krwi oraz poziom glutaminy w płynie mózgowo-rdzeniowym jest znacząco podwyższony w porównaniu z poziomem tych substancji u zdrowych ochotników [Kim i wsp. 1982, Levine i wsp. 2000, Altamura i wsp. 1993, 1995]. Dalsze badania wskazywały, iż kuracja LPD może wpływać na normalizację osłabionego metabolizmu aminokwasów pobudzających [Maes i wsp. 1998]. Aktywacja receptora NMDA, prowadząca do zachodzącego w hipokampie procesu długotrwałej potencjalizacji (LTP) odpowiada również za reakcje nieprzewidywalnego stresu oraz wyuczonej bezradności wywoływanych u zwierząt doświadczalnych [Siwek i wsp. 2005]. Doświadczenia przeprowadzane na ludziach potwierdzają udział receptora NMDA w etiopatogenezie depresji. W korze czołowej ofiar samobójstw dochodzi do zaburzenia funkcji receptora NMDA [Nowak i wsp. 1995], a u osób cierpiących na depresję stwierdzono zmiany ekspresji mRNA kodującego podjednostkę NR1 receptora NMDA w obszarze CA1 hipokampa i na terenie zakrętu zębatego [Law i wsp. 2001]. Badania z użyciem protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego (¹H-MRS) wykazały podwyższony poziom glutaminianu w korze potylicznej pacjentów depresyjnych i obniżony poziom w korze zakrętu obręczy i prawdopodobnie w innych regionach frontalnych [Maeng i wsp. 2007]. Znalaziono też związek pomiędzy zjawiskami takimi jak *kindling* (rozniecanie), zahamowanie neurogenezy w obrębie zakrętu zębatego hipokampa oraz zanik neuronów w odpowiedzi na stres, a nadmierną aktywacją receptora NMDA, znoszoną przez antagonistów tego receptora [Skolnick i wsp. 2001, Gould i wsp. 1999, Cameron i wsp. 1998].

Aktywność przeciwdepresyjna ligandów receptorów glutaminianergicznych

Sugestia, że podwyższona transmisja pobudzająca może mieć związek z patogenezą depresji, była podstawą hipotezy o przeciwdepresyjnych właściwościach substancji hamujących przekazywanie glutaminianergiczne. Pierwsze prace potwierdzające tą

hipotezę opublikowali w 1990 Trullas i Skolnick [Trullas i wsp. 1990]. Wykazano, że funkcjonalni antagoniści receptora NMDA, a więc ligandy miejsca glutamatergicznego (AP7, CGP 37849, CGP 39551), poliaminowego (eliprodil), cynkowego (Zn^{2+}), glicynowego (kwas 7-chlorokynureninowy, ACPC) oraz fencyklidynowego (MK-801, memantyna) są aktywne w testach służących do oceny działania przeciwdepresyjnego, takich jak: test wymuszonego pływania, test zawieszenia za ogon. Co więcej, funkcjonalni antagoniści NMDA, w zwierzęcych modelach depresji jak chroniczny łagodny stres (MK-801, CGP 37849, CGP 40116, ACPC), czy chroniczny nieprzewidywalny stres lub model usunięcia opuszek węchowych (amantadyna, MK-801) wykazują działanie typowe dla LPD [Nowak 2000a, Nowak 2005].

Efekty przedkliniczne antagonistów NMDA potwierdzono we wstępnych badaniach klinicznych na przykładzie ketaminy i metapraminy. **Ketamina** (niekompetytywny antagonist receptoru NMDA, pochodna fencyklidyny) już po jednorazowym podaniu dożylnym poprawia nastrój pacjentów z ciężką depresją lekooporną w ciągu 72 godzin od momentu podania, co więcej, efekt ten utrzymuje się aż do dwóch tygodni [Berman i wsp. 2000, Boireau i wsp. 1996, Zarate i wsp. 2006, Maeng i wsp. 2007]. Obecnie tak szybki początek działania ketaminy tłumaczy się przesunięciem równowagi w układzie glutaminianergicznym z receptora NMDA na AMPA, co zwiększa synaptyczną potencjalizację. Związane jest to z dodatkową właściwością ketaminy, jaką jest presynaptyczne uwalnianie glutaminianu. Uwolniony glutaminian faworyzuje receptory AMPA, ponieważ receptory NMDA są zablokowane przez ketaminę. Natomiast jej przedłużony efekt tłumaczy się wywoływaniem wczesnych zmian neuroplastycznych [Maeng i wsp. 2007].

Metapramina natomiast (antagonista miejsca fencyklidynowego i inhibitor wychwytu zwrotnego noradrenaliny) mimo dużej aktywności przeciwdepresyjnej została wycofana, ze względu na silne działanie neurotoksyczne [Boireau i wsp. 1996].

Niestety, właśnie **działania niepożądane** antagonistów receptora NMDA, do których należą efekty psychozomimetyczne, zaburzenia pamięci, zaburzenia motoryczne, wywoływanie zależności czy indukcja procesów neurodegeneracyjnych wykluczają większość tych substancji z grupy potencjalnych LPD. Obecnie poszukiwania nowych LPD zawężono do **antagonistów o niskim powinowactwie do receptora NMDA**, takich jak **memantyna** czy **amantadyna** oraz **ligandów miejsca glicynowego** np. 7-CKA, 5,7-DCKA, D-cykloseryna, ACPC [Pałucha i wsp. 2005, Siwek i wsp. 2005, Maeng i wsp. 2007]. Związki, które są selektywnymi antagonistami podjednostki NR2B

(np. Ro 25-6981) posiadają zdecydowanie mniejszą zdolność do wywoływania efektów ubocznych charakterystycznych dla antagonistów NMDA [Maeng i wsp.2007]. Przeprowadzono pierwsze badania kliniczne z użyciem selektywnych antagonistów podjednostki NR2B receptora NMDA (CP-101,606) u pacjentów z depresją lekooporną, które wskazują na ich skuteczność i bezpieczeństwo. Selektywni antagoniści podjednostki NR2B receptora NMDA mają ogromną szansę stać się nową grupą antydepresantów cechującą się szybszym początkiem działania, silniejszym efektem, wyższą skutecznością również w przypadku depresji lekoopornych [Preskorn i wsp. 2009].

Ciekawym kierunkiem badań jest możliwość zapobiegania efektom stymulacji receptora NMDA poprzez **blokadę syntezy NO**. Do aktywacji syntazy NO dochodzi w wyniku doneuronalnego napływu jonów wapnia przez otwarty kanał receptora NMDA. Powstający NO, będący wstecznym neurotransmiterem dyfunduje do zakończeń presynaptycznych indukując dalsze uwalnianie glutaminianu, co w warunkach fizjologicznych ma znaczenie w procesie długotrwałej potencjalizacji, natomiast w warunkach patologicznych może nasilać zjawisko ekscytotoksyczności. Inhibitory syntazy NO (błękit metylenowy, L-NMMA, L-NNA, L-NAME) wykazują w teście wymuszonego pływania działanie przeciwdepresyjne porównywalne do imipraminy [Rameau i wsp. 2004, Maffei i wsp. 2003].

Na receptor NMDA wpłynąć mogą również **substancje o działaniu pośrednim** np. **LY392098**, wykazujący zdolność do potencjalizacji aktywności receptorów AMPA. Prowadzi to do zmian w układzie glutaminianergicznym polegających na zmniejszeniu ilości pobudzeń receptorów NMDA na rzecz receptorów AMPA i kainianowych w krytycznych sieciach neuronalnych. Na receptor AMPA uwagę badaczy zwrócił fakt, że potencjalizatory (pozytywne allosteryczne modulatory) AMPA tzw. **AMPAkiny silnie stymulują produkcję BDNF** [Skolnick i wsp. 2001, Li i wsp. 2003]. W dodatku potencjalizatory receptora AMPA wykazują działanie przeciwdepresyjne w zwierzęcych modelach depresji [Li i wsp. 2001].

Istotnym elementem przeciwdepresyjnej aktywności antagonistów receptora NMDA jest ich zdolność do zwiększania uwalniania glutaminianu, wynikająca z blokady receptorów presynaptycznych (autoreceptorów) lub GABA-ergicznymi interneuronów. Wzrost stężenia glutaminianu w synapsie indukowany np. przez ketaminę może aktywować receptory AMPA. Maeng i współpracownicy wysunęli, więc hipotezę, że antydepresyjne działanie ketaminy, jak również innych antagonistów NMDA może wynikać właśnie z tego mechanizmu i przeprowadzili badania behawioralne, w których przeciwdepresyjne

działanie niektórych antagonistów NMDA było znoszone przez związek **NBQX**, antagonistę receptora AMPA [Maeng i wsp. 2008, Dybała i wsp. 2008].

Sugeruje się, zatem, że **aktywacja receptora AMPA może stanowić wspólny punkt końcowy przeciwdepresyjnego działania antagonistów NMDA** [Skolnick i wsp. 2008]. Badania wykazały również, że długotrwałe podania LPD (reboksetyna, fluoksetyna, dezipramina) indukują powierzchniową ekspresję receptora AMPA przez zmianę poziomu fosforylacji dla specyficznych podjednostek AMPA [Barbon i wsp. 2006]. Podsumowując zarówno aktywacja receptora AMPA, jak i inhibicja receptora NMDA są zaangażowane w działanie przeciwdepresyjne.

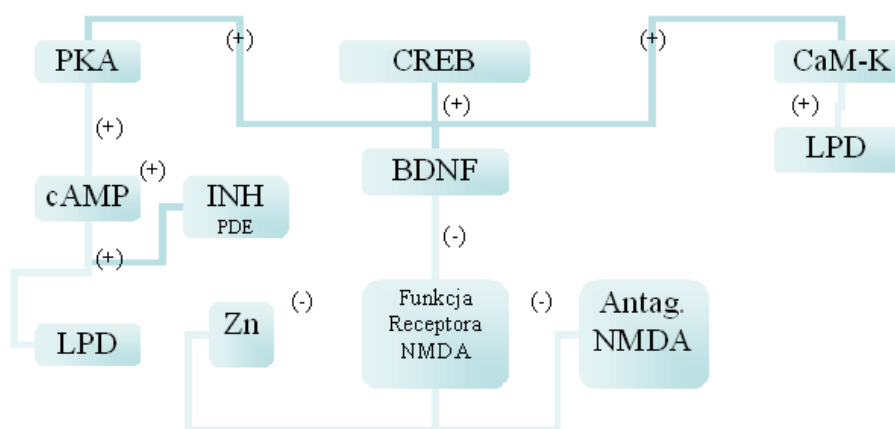
Zmiany adaptacyjne w obrębie układu glutaminianergicznego

Glutaminianergiczne receptory jonotropowe

W badaniach eksperymentalnych zaobserwowano, że na skutek długotrwałego podawania LPD, należących do różnych grup (TLPD, SSRI, inhibitory MAO, inhibitory wychwytu serotoniny i noradrenaliny oraz nietypowe LPD), a także elektrowstrząsów dochodzi do powstawania zmian adaptacyjnych w obrębie receptora NMDA, prowadzących do osłabienia jego funkcji. Z drugiej strony natomiast wzrost powinowactwa glicyny do miejsc glicynowych receptora NMDA widoczny jest w modelu chronicznego łagodnego stresu u szczurów [Nowak i wsp. 1998a]. **Funkcjonalna desensytyzacja** receptora NMDA przejawiają się: **spadkiem powinowactwa glicyny do jej miejsca wiążącego w kompleksie receptora NMDA** (miejsce Gly_B) oraz **zmniejszeniem modulacji pomiędzy miejscem glicynowym a glutaminianergicznym** w korze mózgowej myszy i szczura, **opóźnieniem procesu wiązania selektywnego liganda do miejsca fencyklidynowego** oraz **wzrostem powinowactwa cynku do cynkowego miejsca modulacyjnego** w korze mózgowej myszy, co związane jest z nasileniem zdolności cynku do hamowania tego receptora [Layer 1995, Nowak 1993, 1996, 1998a,b Paul 1993, Szewczyk 2001]. Zmienia się również wzajemna proporcja podjednostek białkowych budujących receptor oraz ich kompozycja [Skolnick 1999]. Długotrwałe stosowanie LPD może więc prowadzić do osłabienia przewodnictwa glutaminianergicznego. Hamowanie funkcji receptora NMDA poprzez zmniejszanie pobudzającego wpływu glutaminianu na hamujące interneurony GABA-ergiczne może prowadzić pośrednio do zwiększenia pobudzenia w o.u.n. [Pilc 2000].

Hipoteza Skolnick'a

Połączeniem hipotezy neurotroficznej [Duman i wsp. 1997] i glutamatergicznej [Skolnick i wsp. 1996] jest hipoteza wysunięta przez Skolnick'a [Skolnick 1999]. Mówi ona, że pod wpływem LPD (SNRI, IMAO) dochodzi do wzrostu poziomu neurotransmitera noradrenaliny w szczeliny synaptycznej, co powoduje stymulację receptorów β -adrenergicznych, prowadzącą do zwiększenia poziomu cAMP w komórce. Wielokrotne podania LPD wywołują β -„down”- regulację. Podwyższony poziom noradrenaliny może jednak kompensować spadek ilości receptorów, więc stężenie cAMP w komórce może być nawet wyższe niż przed podaniem LPD. Do zwiększenia stężenia cAMP prowadzą też inhibitory fosfodiesterazy (INH PDE), związki o udowodnionej aktywności przeciwdepresyjnej, które hamują metabolizm cAMP. Wzrost stężenia cAMP w komórce prowadzi do nasilenia transdukcji sygnału i wzrostu ilości kinazy białkowej A (PKA), czego rezultatem jest zwiększenie procesów fosforylacji, w tym fosforylacji czynnika transkrypcyjnego CREB. Do tego samego efektu prowadzą również LPD działające poprzez układ serotoniny (np. SSRI, IMAO) oraz poprzez kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny (CaM-K). Ufosforylowany CREB zwiększa poziom mózgowego czynnika neurotrofowego (BDNF), który może redukować syntezę niektórych podjednostek receptora NMDA prowadząc do osłabienia jego funkcji. Bezpośrednie osłabienie funkcji receptora NMDA wywoływane jest z kolei przez antagonistów NMDA [Skolnick 1999, Nowak 2000b].



Ryc. 4. Hipoteza Skolnick'a. Wpływ LPD, antagonistów NMDA oraz cynku na kompleks receptora NMDA. INH PDE - inhibitory fosfodiesterazy.

Glutaminianergiczne receptory metabotropowe

Rolą glutaminianergicznych receptorów metabotropowych jest modulacja neurotransmisji dla glutaminianu, ale również dla innych transmiterów zaangażowanych w regulację nastroju, która odbywa się na drodze presynaptycznej regulacji uwalniania neuroprzekaźnika lub poprzez modulację postsynaptycznej odpowiedzi na glutaminian i regulację pobudliwości neuronalnej. Modulacja transmisji glutaminianergicznej poprzez receptory metabotropowe może być sposobem na osiągnięcie pożądanych w terapii depresji zmian w obrębie układu glutaminianergicznego bezpiecznie, bez ryzyka groźnych działań niepożądanych towarzyszących stosowaniu antagonistów receptora NMDA.

Badania dowodzą, iż chroniczne stosowanie LPD powoduje powstawanie zmian adaptacyjnych metabotropowych receptorów glutaminianergicznych, a ligandy tych receptorów wykazują aktywność przeciwdepresyjną.

Powtarzalna ekspozycja na LPD obniża wrażliwość receptorów metabotropowych grupy I w mózgu [Pilc i wsp. 2008]. Zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji dla białek receptora mGluR5a w polu CA1 hipokampa po przewlekłych podaniach imipraminy oraz w polu CA3 po terapii ECS, jak również dla białek receptora mGluR1a w rejonie rogu Ammona po chronicznym stosowaniu ECS [Śmiałowska i wsp. 2002]. Badania Martisciano podają z kolei wzrost ekspresji receptorów mGluR1a w hipokampie przy braku zmian ekspresji dla receptora mGluR5 po długotrwałych podaniach imipraminy [Martisciano i wsp. 2002]. Efekt „up”- regulacji może być wyrazem zmian kompensacyjnych w stosunku do zmniejszenia wrażliwości receptorów. Selektywni antagoniści receptorów mGluR5 (MPEP, MTEP) oraz mGluR1 (EMQMCM) wykazują aktywność przeciwdepresyjną w zwierzęcych testach i modelach depresji [Pilc i wsp. 2008].

W grupie II receptorów mGluR pod wpływem przewlekłego podawania imipraminy powstają zmiany adaptacyjne w receptorach postsynaptycznych mGluR2 i mGluR3 polegające na „up”- regulacji białek receptorowych, natomiast funkcja receptorów presynaptycznych zostaje osłabiona [Martisciano i wsp. 2002, 2005, Pilc i wsp. 2008]. Badanymi ligandami (antagonistami) receptorów grupy II są związki: MGS0039 i LY431495 [Pilc i wsp. 2008].

Niewiele wiadomo na temat udziału receptorów mGluR grupy III w patomechanizmie depresji i działaniu LPD. Wykazano obniżenie ekspresji receptorów mGluR7 w korze mózgowej i hipokampie po przewlekłych podaniach citalopramu, lecz nie imipraminy [Wierońska i wsp. 2007]. W badaniach eksperymentalnych wykazano przeciwdepresyjne

właściwości związków: ACPT-I, agonisty receptorów III grupy mGlu, AMN082, agonisty mGluR7 oraz RS-PPG agonisty receptora mGlu8 [Pilc i wsp. 2008].

Wydaje się, że zastosowanie potencjalnie skutecznych antagonistów I i II grupy mGluR oraz agonistów grupy III mGluR pozwoli zmniejszyć aktywność nadmiernie pobudzonego układu glutaminianergicznego w depresji przy jednoczesnym wyeliminowaniu efektów ubocznych charakterystycznych dla antagonistów NMDA.

CYNK W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

Cynk w organizmie człowieka

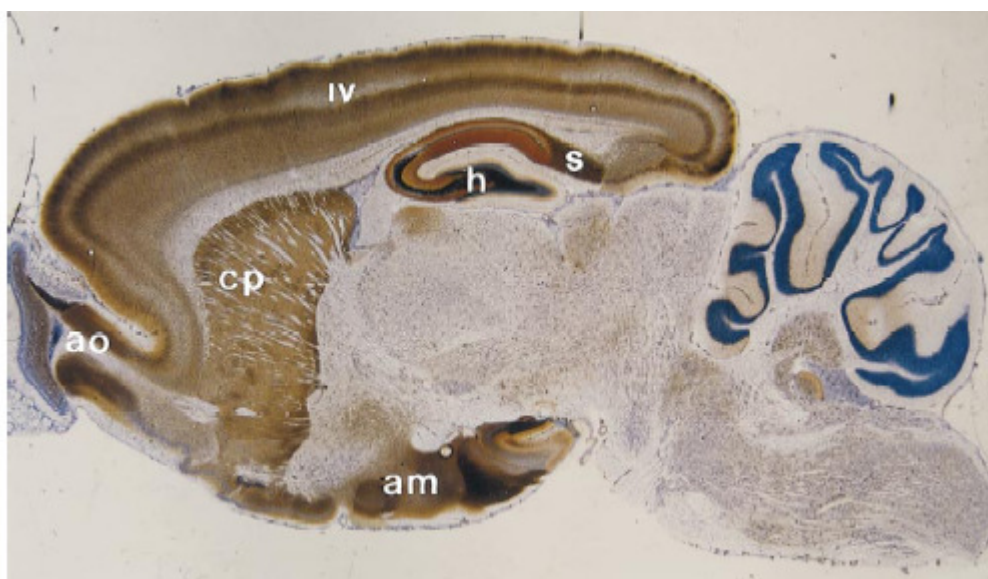
Cynk jest jednym z najważniejszych i najobficiej występujących pierwiastków śladowych. **Organizm człowieka zawiera 2-2.5 g cynku**, przy dziennym zapotrzebowaniu wynoszącym 10-15 mg [Cousins 1985]. Wchłanianie cynku jest odwrotnie proporcjonalne do jego zawartości w diecie [Schlegel- Zawadzka i wsp. 2001]. Biometal ten **wchodzi w skład ponad 300 enzymów, w których pełni funkcję katalityczną, strukturalną i regulacyjną**. Jest niezbędny w procesach replikacji DNA, transkrypcji, syntezy białek [Prasad 1993, Vallee 1993]. W organizmach żywych występuje jedynie w formie **jonu dwuwartościowego Zn²⁺**. **Niedobór cynku** prowadzi do spadku masy ciała, zahamowania wzrostu, opóźnienia dojrzewania, spadku odporności, a także do zaburzeń psychicznych, w tym anoreksji, dysforii, stanów lękowych, upośledzenia procesów uczenia się, funkcji poznawczych oraz niektórych chorób neurologicznych (np: choroba Alzheimera, Parkinsona), [Takeda 2000, Takeda i wsp. 2007].

Zawartość i rozmieszczenie cynku w mózgu

W roku 1943 Sheline i wsp. donieśli o wychwycie cynku przez mózg u myszy i psów [Sheline i wsp. 1943]. Ponad dekadę później, Maske, używając histochemicznej metody barwienia, odkrył wymienialną pulę cynku w mózgu [Maske 1955]. Tak rozpoczęły się badania nad rozmieszczeniem i funkcją jonów cynku w ośrodkowym układzie nerwowym. Spośród wszystkich organów **mózg zawiera najwięcej cynku**, a jego średnie stężenie wynosi 150 μM. Stanowi to ilość ponad stukrotnie większą niż klasycznych neurotransmitterów (np. monoamin) i zaledwie sześciokrotnie mniejszą niż jonów wapnia. [Frederickson 1989, Takeda 2000]. Stężenie jonów cynku w mózgu zwiększa się wraz ze wzrostem organizmu i utrzymuje się na stałym poziomie w dojrzałym mózgu. Obrót cynku w mózgu jest znacznie wolniejszy niż w tkankach peryferyjnych np. w wątrobie,

w związku z obecnością bariery krew- mózg oraz krew- płyn mózgowo- rdzeniowy [Takeda 2000].

Rozmieszczenie jonów cynku w mózgu jest nierównomierne. Wyższe stężenie występuje w istocie szarej, w porównaniu z istotą białą. **Obszarami o najwyższym stężeniu jonów cynku są: włókna mszyste hipokampa**, gdzie, w pęcherzykach synaptycznych, osiąga ono wartości 300-350 μM oraz jądro migdałowe i kora mózgowa. Badania poszczególnych frakcji organelli komórkowych wykazały największą ilość jonów cynku we frakcji jądrowej (34-58%), mniej we frakcji mitochondrialnej (15-22%), cytozolowej (16%) i synaptosomalnej (15%) [Frederickson 1989].



Ryc. 5 Przekrój w płaszczyźnie strzałkowej przez mózg szczura po wybarwieniu autometalograficznym (złoto-brązowo-czarne plamy- barwienie metodą Timma- Danschera; niebieskie- metodą Nissla). Najintensywniej zabarwione miejsca to obszary najbardziej obfitujące w cynk *subiculum* (s) *hilus of dentate gyrus* (h) *mossy fibers* [z Frederickson 2000].

Transport cynku do mózgu

Transport cynku z krwi do mózgu odbywa się poprzez barierę krew- mózg oraz barierę krew- płyn mózgowo rdzeniowy. Badania na sztucznym modelu bariery krew - mózg wykazały, że bariera ta zapewnia utrzymanie homeostazy cynku w okresach niedoboru lub nadmiaru tego pierwiastka [Lehmann i wsp. 2002].

Stężenie cynku w surowicy krwi wynosi 15 μM . Cynk osoczowy dzieli się na trzy frakcje: frakcję związaną z białkami takimi jak: albumina, transferyna, α_2 -makroglobulina, ceruloplazmina, haptoglobina (98%), frakcję związaną z ligandami o niskiej masie

cząsteczkowej (1-2%) oraz frakcję wolnego cynku, którego stężenie oszacowano zaledwie na 10^{-9} - 10^{-10} M, co stanowi najmniejszą pulę wymienialnego cynku w osoczu. Największą zaś pulę stanowi cynk związany z albuminami, które jednak nie są istotne w transporcie cynku do mózgu. Kolejną pulą wymienialnego cynku w osoczu stanowi cynk związany z aminokwasami: histydyną i cysteiną. Histydyna pełni istotną funkcję w pokonywaniu bariery krew- mózg przez cynk [Takeda 2000, 2001]. Szybkość i wielkość domózgowego transportu cynku są determinowane stężeniem cynku we krwi [Lehmann i wsp. 2002]. Mechanizm transportu cynku ze śródbłonna i nabłonka do płynu mózgowo- rdzeniowego nadal pozostaje niewyjaśniony [Takeda 2000, 2001]. Cynk pobierany jest prawdopodobnie zarówno przez błonę ciała komórki nerwowej, jak i zakończenia aksonalne, a także transportowany do neuronów pośrednio, przy udziale komórek glijowych. Olbrzymia różnica stężeń cynku pomiędzy płynem międzykomórkowym ($0.15 \mu\text{M}$), a cytozolem neuronów ($150 \mu\text{M}$), sugeruje udział specyficznych transporterów cynku (transportery z rodziny Zip), [Frederickson 1989, Takeda 2000 Law i wsp. 2003].

Pule cynku w mózgu

Występujący w mózgu cynk można zasadniczo zaklasyfikować do dwóch oddzielnych puli: białkowej i synaptycznej.

Pierwsza **pula, białkowa**, stanowiąca około 90% całkowitej zawartości cynku w mózgu obejmuje cynk związany z metaloenzymami. Należą do nich enzymy cytoplazmatyczne (np: dysmutaza ponadtlenkowa, fosfodiesteraza), enzymy mitochondrialne (np. oksydaza cytochromowa, karboksylaza pirogronianowa), jądrowe (np. polimeraza DNA, RNA), enzymy aparatu Golgiego (peptydazy, mannozydazy). Jony cynku budują również strukturę białek strukturalnych, regulatorowych, w tym czynników transkrypcyjnych oraz tworzą tzw. "**palce cynkowe**" (sekwencje umożliwiające wiązanie czynników transkrypcyjnych do DNA). We wszystkich tych strukturach jony cynku są na stałe związane, dlatego też tworzą one stabilną pulę zaangażowaną tylko w specyficzne funkcje białek, w których występują [Vallee i wsp. 1993, Frederickson 1989].

Drugą, **pulę synaptyczną**, stanowiącą około 5- 15 % całkowitej ilości cynku w mózgu tworzy cynk jonowy w formie niezwiązanej, zawarty w pęcherzykach presynaptycznych, zwany inaczej **cynkiem histochemicznie reaktywnym** (uwidaczniany metodą barwienia Timma i jej modyfikacjami), **cynkiem pęcherzykowym, synaptycznym** lub **chelatowalnym** [Frederickson 1989, 2003].

Cynk synaptyczny jest wybiórczo przechowywany i uwalniany z małych, owalnych pęcherzyków synaptycznych specyficznych neuronów, tzw. **neuronów cynkoergicznych - ZEN** (ang. *zin - enriched neurons*). Neurony te, w korze mózgowej, jądrze migdałowatym i hipokampie to neurony glutaminianergiczne, uwalniające glutaminian (ang. *gluzinergic, zinc- containing neurons*), [Li i wsp. 2003, Frederickson 2005]. Ciała komórek ZEN zlokalizowane są prawie wyłącznie w korze mózgowej oraz jądrach ciała migdałowatego, skąd wysyłają swoje projekcje do: kory mózgowej i ciała migdałowatego, prążkowie, struktur układu limbicznego. Systemy przekaźnikowe zawierające cynk to zatem przede wszystkim szlaki: korytko- korytkalne, korytko- limbiczne i limbiczno- korytkalne [Frederickson i wsp. 2001]. Uważa się, że szlaki te związane są z funkcjonowaniem pamięci epizodycznej, ekspresją emocji, zachowań oraz działań poznawczo- pamięciowych [Takeda i wsp. 2004].

Istnieją jeszcze dwie grupy neuronów zawierających cynk: występujące w mózdku i rdzeniu kręgowym neurony związane z transmisją GABA- ergiczną [Wang i wsp. 2002, Smart i wsp. 1994] oraz występujące jedynie w rdzeniu kręgowym neurony glicynergiczne [Birinyi i wsp. 2001].

Czasem wyróżnia się jeszcze trzecią, czysto **hipotetyczną pulę cynku "wolnego"**, który jest natychmiast wiązany. Jest to cynk tzw. szybko- wymienialny (ang. *rapidly exchangeable*), uwalniany do przestrzeni synaptycznej w pobliżu neuronu docelowego, jedynie w szczególnych okolicznościach [Frederickson 2003].

Magazynowanie cynku w neuronie. Transportery cynku

Cynk jest małą, hydrofilową, wysoko naładowaną cząsteczką, która nie przechodzi przez błony biologiczne w procesie pasywnej dyfuzji. Dlatego też niezbędne są specjalne mechanizmy zarówno dla jej wychwytu, jak i uwalniania [McMahon i wsp. 1998].

Transportery dla cynku u ssaków są białkami o domenach transbłonowych, kodowanymi przez dwie rodziny genów SLC (ang. *solute- linked carrier*): **ZnT (SLC30) oraz ZIP (SLC39)**. Poznano dotychczas 10 transporterów typu ZnT oraz 15 typu ZIP [Liuzzi i wsp. 2004, Nakashima i wsp. 2009].

Pełnią one przeciwstawną rolę w utrzymywaniu homeostazy cynku. Transportery z rodziny **ZIP** (ang. *Zrt- Irt- like proteins*) **zwiększają wewnątrzkomórkową dostępność cynku** poprzez promowanie wychwytu z zewnątrz komórek i prawdopodobnie zwiększają uwalnianie cynku z pęcherzyków synaptycznych do cytoplazmy. Transportery z rodziny

ZnT natomiast promują **wypływ z komórek lub wychwyt do pęcherzyków synaptycznych**, redukując poprzez to wewnątrzkomórkowe stężenie jonów cynku.

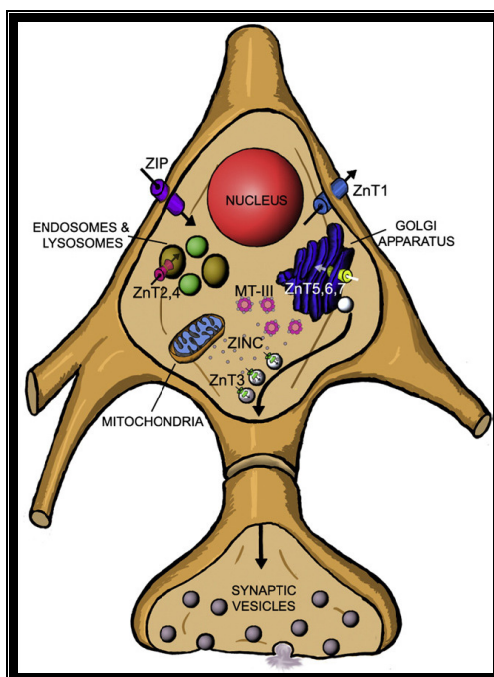
Transportery ZnT (1,2,4,5,6,7) znajdują się w większości komórek, również w neuronach. Ich rola została dokładnie scharakteryzowana w różnych rejonach ciała, jednak stosunkowo mało wiadomo o mechanizmie neuronalnego transportu cynku.

Pierwszym odkrytym transporterem cynku był wszechobecny w mózgu **ZnT1-komórkowy eksporter cynku**, odpowiadający za jego wewnątrzkomórkową homeostazę [McMahon i wsp. 1998, Cousins i wsp.2000, Liuzzi i wsp. 2004, Palmiter i wsp. 1995]. ZnT2 i ZnT4 transportują cynk do endosomów i lizosomów. ZnT 5,6,7, są zlokalizowane na aparacie Golgiego. ZnT 8.9.10 zostały odkryte niedawno i niewiele jeszcze na ich temat wiadomo.

Unikalnym dla mózgu białkiem transportującym cynk jest ZnT3. Transporter ZnT3 zdobi błony wszystkich małych, okrągłych pęcherzyków synaptycznych włókien mszystych hipokampa u myszy i małp. 60-80% tych pęcherzyków zawiera cynk synaptyczny, co sugeruje, że **ZnT3 odpowiada za transport cynku do pęcherzyków** [Wenzel i wsp. 1997]. Co więcej ZnT3 kontroluje nie tylko ilość cynku szybkowymienialnego (histochemicznie reaktywnego), ale również całkowitą ilość cynku w pęcherzykach synaptycznych neuronów cynkoergicznych [Linkous i wsp. 2008]. mRNA dla transportera ZnT3 wykryto w mózgu i jądrach gryzoni [Liuzzi i wsp. 2004, McMahon i wsp. 1998, Cousins i wsp.2000], ludzkich liniach komórkowych nabłonka piersi oraz w grasicy u myszy [Luizzi i wsp. 2004]. Natomiast białko ZnT3 obserwowano w hipokampie, korze mózgowej i rdzeniu kręgowym myszy. W dojrzałym mózgu mysim ekspresja tego transportera pokrywa się z lokalizacją neuronów glutaminianergicznych zawierających cynk synaptyczny, w włóknach mszystych hipokampa [Luizzi i wsp. 2004]. Obecność transportera ZnT3, o wysokim powinowactwie do jonów Zn^{2+} pomaga utrzymać niskie stężenie cynku w cytoplazmie neuronów poprzez istotne dla funkcjonowania neuronów upakowanie wolnego cynku do pęcherzyków synaptycznych [Cousins i wsp. 2000, Ketterman i wsp. 2008]. Myszy pozbawione genu kodującego ZnT3 nie posiadają cynku histochemicznie reaktywnego w pęcherzykach [Frederickson 2000].

Inną grupę białek zaangażowaną w obrót cynku stanowią tzw. **metalotioneiny (MT)**. Tioneiny to małe białka (ok. 3000 Da) zawierające miejsca cysteinowe, o właściwościach wiązania metali, w tym cynku. Ich funkcja w warunkach fizjologicznych polega na **przyjmowaniu cynku od innych ligandów wiążących cynk**. Potrafią one związać siedem atomów cynku w dwudziestu miejscach cysteinowych w tzw. klastry cynkowe. Procesy

oksydacji lub nitrozytacji miejsc cysteinowych uwalniają związany cynk, tak więc MT działają również jako donory cynku. Metalotioneina- 3 (**MT-III**) jest **izoformą charakterystyczną wyłącznie dla mózgu**, co więcej tylko w neuronach zawierających cynk synaptyczny [Frederickson 2005]. Stanowi ona regulator dostępności cynku w mózgu.



Ryc. 6. Transportery istotne dla utrzymania homeostazy cynku w neuronie [z Nakashima 2009].

Uwalnianie i wychwyty zwrotny

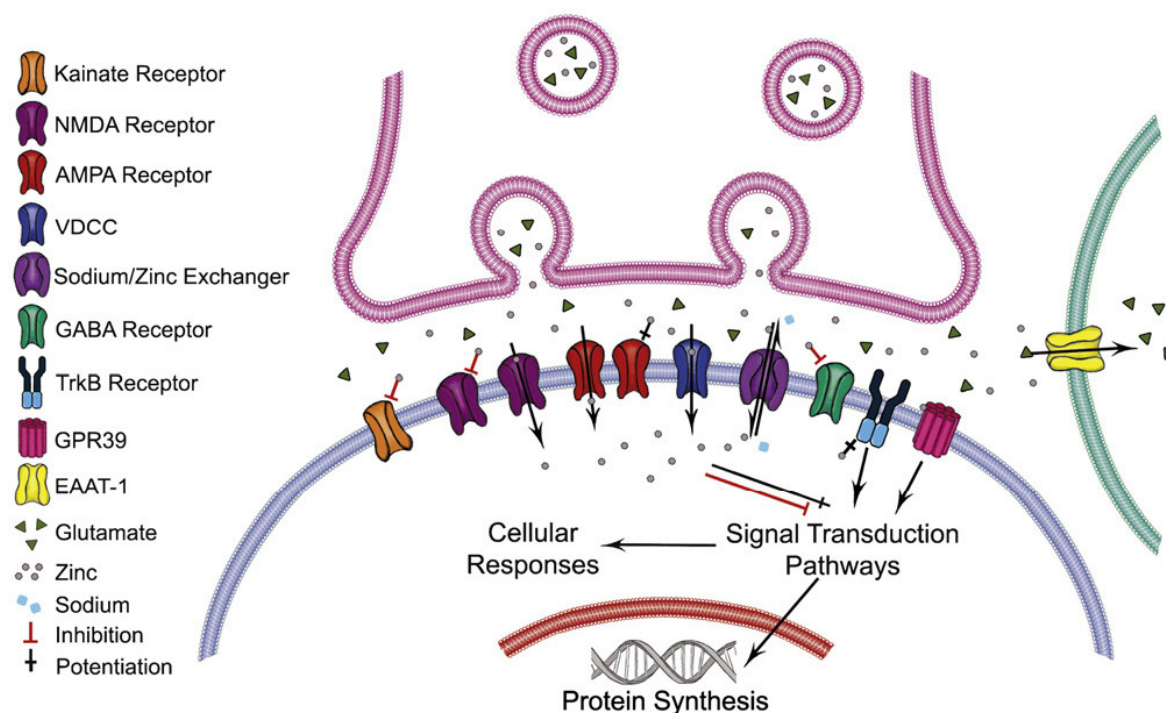
Stymulacja dróg nerwowych zawierających histochemicznie reaktywny cynk powoduje uwolnienie jonów cynku z pęcherzyków synaptycznych do szczeliny synaptycznej na drodze egzocytozy zależnej od jonów wapnia [Pérez-Clausell i wsp. 1986, Katterman i wsp. 2008]. Wówczas jego stężenie w szczeliny synaptycznej może przejściowo wzrastać do przedziału 100-300 μM , podczas gdy w neuronie wynosi zaledwie 10 μM [Frederickson 2005]. W określonych warunkach (występujące jednocześnie uwalnianie presynaptyczne i otwarcie kanałów postsynaptycznych) **cynk może przemieszczać się z wnętrza neuronu presynaptycznego do wnętrza neuronu postsynaptycznego**. Ponieważ zarówno glutaminian, jak i depolaryzacja otwierają kanały przepuszczalne dla cynku, maksymalna translokacja jonów cynku następuje **podczas intensywnej aktywności neuronalnej**.

Początkowo sądzono, że ma to związek jedynie ze zjawiskiem **ekscytotoksyczności** i może przyczyniać się do rozwoju procesów patologicznych (w sytuacji uszkodzenia tkanki mózgowej podczas niedokrwienia, napadu padaczkowego, urazu mózgu) indukujących śmierć komórki [Frederickson i wsp. 2004, Frederickson 2005, Ketterman i wsp. 2008, Nakashima i wsp. 2009]. Dzieje się tak w przypadku masywnej i niekontrolowanej penetracji cynku wraz z glutaminianem do wnętrza neuronu postsynaptycznego. Dochodzi wówczas do egzocytozy nawet wszystkich pęcherzyków przechowujących cynk, czego rezultatem jest kilkukrotne przekroczenie jego fizjologicznego stężenia w szczelinie synaptycznej. Przy niewydolnych mechanizmach wychwytu zwrotnego może dochodzić do translokacji olbrzymiej ilości cynku do wnętrza neuronu postsynaptycznego, czego efektem jest uruchomienie procesów apoptozy [Frederickson i wsp. 2000].

Obecnie, na podstawie przeprowadzonych badań, uważa się, że również w warunkach fizjologicznych, cynk może wchodzić do neuronu postsynaptycznego i wyzwać całą gamę efektów. Jony cynku są jedynymi jonami metali, które podlegają uwalnianiu, tak jak neurotransmitery w procesie transmisji synaptycznej i spełniają **funkcję neuromodulującą** [Ketterman i wsp. 2008]. Ciała neuronów i dendryty usiane są przepuszczalnymi dla cynku, bramkowanymi kanałami, które są jednocześnie przepuszczalne dla jonów wapnia, takimi jak: **kanał receptora NMDA, bramkowane napięciem kanały wapniowe (VDCC) oraz przepuszczalne dla wapnia kanały receptora AMPA i kainianowego**. Potwierdziły to badania z użyciem techniki magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i badania fluorescencyjne [Frederickson 2005]. Dodatkowe drogi wejścia związane są z funkcjonowaniem wymiennika sodowo-cynkowego oraz transporterów ZIP [Nakashima i wsp. 2009]. Przechodzący do neuronu postsynaptycznego cynk zmienia swą funkcję z neurotransmitera na **drugi przekaźnik** wchodzący w interakcję z kinazami (PKC, CaMKII, TrkB, SFK) oraz proteinami jądra komórkowego [Li i wsp. 2001, Yamasaki i wsp. 2007, Nakashima i wsp. 2009].

Istnieją również dowody na występowanie receptorów, których ligandem jest endogenne cynk. Pierwotnie odkryto je w kulturach komórek kolonocytów, ostatnie doniesienia sugerują, że są one obecne także w mózgu. **Receptor cynkowy - GPR39** to receptor związany z białkiem G, zaliczany przez swoje podobieństwo do rodziny receptorów dla greliny. Wysoką ekspresję tego receptora zaobserwowano w hipokampie, jądrze migdałowatym i korze słuchowej. Receptor jest sensorem sygnalizującym

zewnątrzkomórkowe stężenia jonów cynku. Jego aktywacja prowadzi do zwiększenia syntezy cAMP i aktywności transkrypcyjnej [Holst i wsp. 2007, Nakashima i wsp. 2009].



Ryc. 7. Potencjalne działanie cynku w neuronie postsynaptycznym. Cynk w stężeniach fizjologicznych uwalniany z neuronu presynaptycznego wywiera wpływ na receptory w błonie neuronu postsynaptycznego, hamując receptory NMDA, kainianowe i GABA, oraz potencjalizując receptory AMPA. Cynk może również dyfundować do pobliskich komórek glejowych i hamować EAAT-1. Do neuronu postsynaptycznego cynk może wchodzić poprzez kanały receptorów NMDA, AMPA, napięciowalnego kanału wapniowego VDCC oraz wymiennik sodowo- cynkowy. Cynk może modulować ścieżki przekazywania sygnału (CaMKII, PKC i cAMP) bezpośrednio lub pośrednio poprzez aktywację receptora cynkowego GPR39 [z Nakashima 2009].

Mechanizm wychwytu zwrotnego cynku nie jest do końca poznany. Cynk uwolniony do szczeliny synaptycznej jest następnie pobierany zwrotnie (wychwyt o wysokim powinowactwie) przez zakończenia cynkoergiczne, ale również przez perikarion. Przypuszcza się również, że w pobieraniu cynku do neuronów uczestniczą także komórki glejowe [Takeda 2000]. Część uwolnionego do szczeliny synaptycznej cynku zostaje związana przez pozakomórkowe ligandy takie jak glutation, albumina czy histydyna. Odpowiadają one za usuwanie nadmiaru cynku i utrzymywanie jego fizjologicznych stężeń [Palmiter i wsp. 1996, Li i wsp. 2001].

CYNK W PATOFIZJOLOGII DEPRESJI

Historia badań

W roku 1983 Hansen i wsp. donieśli o przypadkach pacjentów z depresją lekooporną (TRD), u których poziom cynku w osoczu był znacznie obniżony [Hansen i wsp. 1983]. Siedem lat później McLoughlin i Hodge odkryli, że pacjenci cierpiący na depresję cechują się znacząco obniżonym stężeniem cynku w osoczu w porównaniu z osobami zdrowymi, co więcej klinicznej poprawie towarzyszy wzrost obniżonego poziomu cynku [McLoughlin i wsp. 1990]. Potwierdziły to badania, w których dodatkowo znaleziono negatywną korelację pomiędzy natężeniem depresji, a poziomem cynku w osoczu [Maes i wsp. 1994, Nowak i wsp. 1999b, Schlegel-Zawadzka i wsp. 2000]. Zaproponowano hipotezę według której zmniejszony poziom cynku w depresji może być zmianą wtórną do odpowiedzi immunologicznej/zapalnej, a wręcz może odzwierciedlać obecność ostrej fazy tej odpowiedzi. Kolejna praca Maesa i wsp. doniosła, że najniższy poziom cynku cechuje pacjentów z TRD, a analiza danych wykazała, że obniżony poziom cynku w osoczu może być uznany za wrażliwy i specyficzny marker TRD. Nie znaleziono natomiast zależności pomiędzy terapią LPD, a normalizacją poziomu cynku w osoczu. Fakt ten może wynikać z doboru populacji do badań (głównie pacjenci z TRD), [Maes i wsp. 1997]. Ten sam zespół wykluczył korelację pomiędzy hipocynkemią występującą u pacjentów depresyjnych a czynnikami hormonalnymi (hiperkortyzolizm) i dietą. Wyniki następnych doświadczeń wyjaśniały, że obniżony poziom cynku w depresji może być częściowo tłumaczony spadkiem poziomu albumin w osoczu, co może mieć związek ze zwiększoną produkcją interleukiny-6 (IL-6) [Maes i wsp. 1999]. Produkcja cytokin i aktywacja układu immunologicznego może, jak wiadomo, indukować rozwój klinicznych objawów depresji [Anisman i wsp. 2005, 2008, Kim i wsp. 2007].

Badania eksperymentalne na zwierzętach - testy biochemiczne

Przewlekłe podania LPD lub terapia ECS prowadzą do zwiększenia stężenia cynku w mózgu szczura

Chroniczne podania citalopramu lub imipraminy zwiększają poziom cynku w hipokampie szczura o ok. 10% obniżając go jednocześnie w korze mózgowej, mózdzku i przodomózgowiu. Porównując poziom cynku obserwowany w hipokampie po użyciu obydwu LPD w stosunku do pozostałych regionów mózgu, wykazano, że poziom cynku w tej strukturze jest większy o ok. 20%. Wyniki te pokazują, że LPD mogą wywoływać redystrybucję lub też reorganizację poziomu cynku w poszczególnych rejonach mózgu. Dodatkowo, podanie citalopramu powoduje wzrost poziomu cynku również w surowicy krwi (ok. 20%).

Natomiast terapia ECS wywołuje aż 30% wzrost poziomu cynku w hipokampie i ok. 11-15% wzrost w korze mózgowej i mózdzku szczura [Nowak i wsp. 1999b]. Metodą barwienia histochemicznego wykazano, że chroniczne ESC powodują rozrastanie się włókien komórek granularnych szlaku mszystego hipokampa, czyli rejonu najbardziej obfitującego w cynk, co sugeruje jednocześnie wzrost puli cynku synaptycznego [Vaidya i wsp. 1999, Lamont i wsp. 2001]. Efekt zwiększenia puli cynku synaptycznego wywołuje też chroniczne podanie samego cynku [Szewczyk i wsp. 2006].

Chroniczne podania cynku zwiększają syntezę BDNF w korze mózgowej szczura

Większość LPD, jak też ECS zwiększają ekspresję genów dla BDNF w hipokampie. Efekt ten obserwowano również w korze mózgowej, lecz tylko po zastosowaniu niektórych LPD i ECS. Najnowsze dane podkreślają, że również cynk, w dawce 11.5 mg/kg, podawany codziennie przez dwa tygodnie podnosił poziom mRNA dla BDNF, ale tylko w korze mózgowej szczura [Nowak i wsp. 2004]. Mechanizm tego zjawiska zachodzi prawdopodobnie przy udziale receptora NMDA. Najnowsze badania z wykorzystaniem techniki *Northernblot* i *Westernblot* wykazały, że wielokrotne podania cynku nasilają ekspresję zarówno mRNA dla BDNF, jak i białka BDNF. Wzrost ekspresji mRNA dla BDNF widoczny jest szczególnie w hipokampie szczura, przy zastosowaniu dawki 10 mg/kg już w 7 dniu stosowania i utrzymuje się w 14 i 35 dniu podań, podczas, gdy w korze efekt ten obserwowany jest dopiero po 35 dniach stosowania tej samej dawki. W korze mózgowej skuteczniejsze okazuje się podanie dawki 65 mg/kg. Wzrost poziomu BDNF obserwowano po 7 i 14 dniach podań cynku, ale jedynie w hipokampie

[Sowa-Kućma i wsp. 2008]. Również grupa Franco potwierdziła, że chroniczne (30 dniowe) podania cynku (doustnie, w dawce 15-18 mg/kg masy ciała) zwiększają poziom ekspresji BDNF w korze mózgowej szczura [Franco i wsp. 2008].

LPD wpływają na interakcję cynku z kompleksem receptora NMDA

Zbadano wpływ wielokrotnych podań imipraminy na powinowactwo cynku do receptora NMDA, które mierzono hamowaniem wiązania [³H]MK-801 do kanału jonowego receptora NMDA w korze mózgowej i hipokampie myszy. Wielokrotnie podawana imipramina znacząco zmniejsza wartość IC₅₀ hamowania wiązania tego liganda przez cynk, co oznacza wzrost powinowactwa cynku do kompleksu receptora NMDA w korze mózgowej, lecz nie w hipokampie myszy. Efekt ten jest specyficzny gatunkowo i nie występuje u szczurów [Szewczyk i wsp. 2001].

Badania eksperymentalne na zwierzętach - testy behawioralne i modele depresji

Cynk działa przeciwdepresyjnie w FST i TST

Cynk wykazuje działanie przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania (FST) zarówno u myszy, jak i szczurów oraz w teście zawieszenia za ogon (TST) u myszy. Co więcej cynk podawany w niskiej nieaktywnej dawce, łącznie z imipraminą w niskiej, nieaktywnej dawce, powoduje znaczne skrócenie czasu bezruchu. Sugeruje to możliwą potencjalizację działania LPD przez ten biometal [Cunha i wsp. 2008, Krocicka i wsp. 2000, 2001, Nowak i wsp. 2003c, Rosa i wsp. 2003].

Niedobór cynku w diecie powoduje objawy depresyjne u szczurów

U szczurów poddanych trzytygodniowej diecie bezcynkowej zaobserwowano zachowania pro- depresyjne takie jak: anoreksja (zmniejszenie przyjmowania pokarmu widoczne już od 10 dnia diety i spadek masy ciała o 25% w stosunku do grup kontrolnych), anhedonia (znamienne obniżenie przyjmowania roztworu sacharozy w stosunku do wody), lęk (mierzony czasem eksploracji w oświetlonych/zaciemnionych boksach), [Tassabehji i wsp. 2008]. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych na myszach poddanych diecie ubogocynkowej (40% dziennego zapotrzebowania) wykazały

nasilenie zachowań pro- depresyjnych w teście pływania i zawieszenia za ogon, które odwracały chroniczne podania dezipraminy [Whittle i wsp. 2009].

Cynk odwraca efekt depresyjny wywołany malationem w FST

Malation jest insektycydem wykorzystywanym w rolnictwie, należącym do grupy związków fosforoorganicznych. Wywołuje on efekt depresyjogenny, przekładający się na zwiększenie czasu bezruchu w teście pływania. Cynk odwraca działanie malationu, obniżając czas bezruchu w FST. Wykazuje też efekt neuroprotekcyny [Brocardo i wsp. 2007].

Cynk jest aktywny w modelach depresji: OB, CUS i CMS

W modelu bulbektomi (OB) zaobserwowano zmniejszenie ilości prób koniecznych do nabycia odruchu biernego unikania i obniżoną ruchliwość oraz ilość wydawanych przez zwierzęta z uszkodzonymi opuszkami węchowymi dźwięków [Nowak i wsp. 2003c].

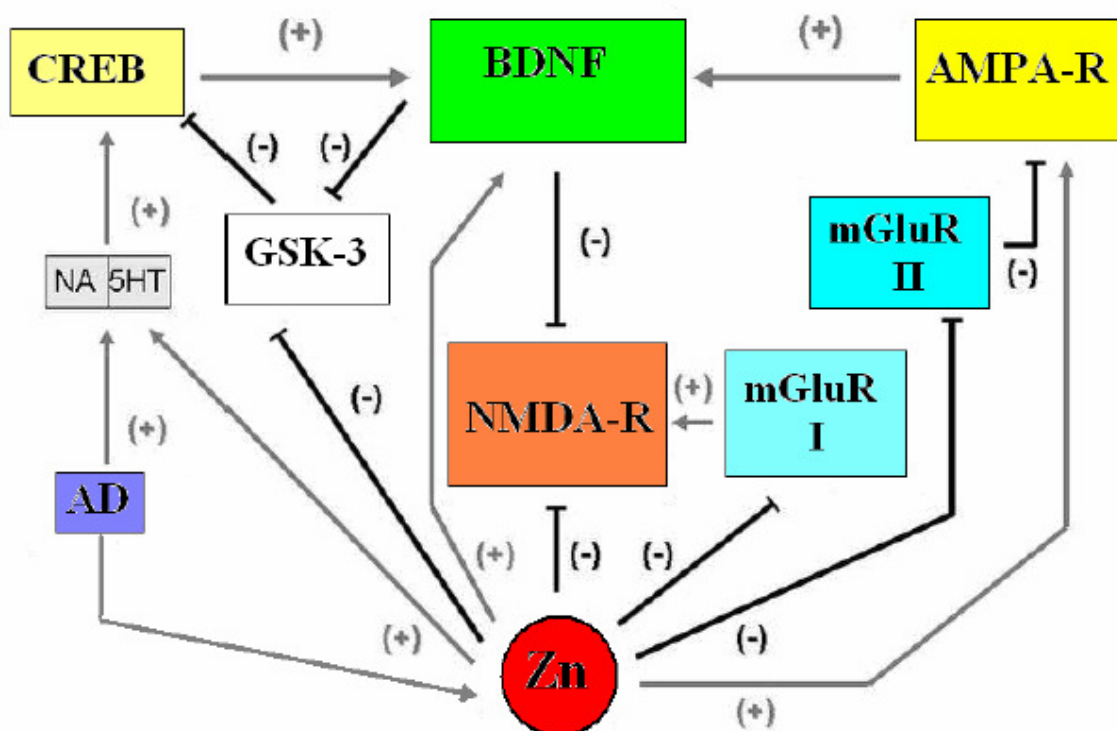
Aktywność przeciwdepresyjną cynku udowodniono również w modelu chronicznego nieprzewidywalnego stresu (CUS), w którym cynk (30 mg/kg/24h wodorooasparaginian) zapobiega zachowaniom pro- depresyjnym (deficyt zachowań agresywnych) zwierząt polegającym [Ossowska i wsp. 2002, Cieslik i wsp. 2007]. Suplementacja cynkiem (niska nieaktywna dawka 15 mg/kg/24h wodorooasparagianu) wzmacnia również efekt działania imipraminy (niskiej, nieaktywnej dawki 5 mg/kg/24h) w tym modelu [Cieslik i wsp. 2007]. Cynk wykazuje również aktywność w modelu chronicznego łagodnego stresu (CMS) u szczurów [Sowa-Kućma i wsp. 2008].

Badania kliniczne

Badania przedkliniczne przeprowadzone na kobietach ciężarnych dowodzą, że obniżony poziom cynku w surowicy krwi współwystępuje z objawami depresji zarówno przed- jak i poporodowej. Wyniki badania pokazują też zależność między nasileniem objawów depresji, a obniżonym stężeniem cynku w surowicy krwi u pacjentek z depresją poporodową [Wójcik i wsp. 2006]. Wykazano też po raz pierwszy korzystne efekty suplementacji cynkiem terapii przeciwdepresyjnej. W badaniu tym pacjentów cierpiących na depresję, leczonych przy pomocy standardowej terapii przeciwdepresyjnej z użyciem TLPD lub SSRI, podzielono na dwie grupy. Jedna z nich dodatkowo otrzymywała 25 mg

cynku raz dziennie. Do oceny skuteczności terapii użyto Skali Depresji Hamiltona (HDRS) i kwestionariusza Becka (BDI) przed jej rozpoczęciem, oraz w 2, 6 i 12 tygodniu leczenia. Suplementacja cynkiem znacząco zredukowała wyniki HRDS i BDI w 6 i 12 tygodniu kuracji w porównaniu z grupą, która otrzymywała placebo [Nowak i wsp. 2003a]. Przeprowadzono też badanie *postmortem* na mózgach samobójców, które jednak nie wykazało różnic w zawartości cynku w hipokampie czy korze mózgowej, w porównaniu z osobami, które zmarły z przyczyn innych niż psychiatryczne. Dowiedziono natomiast, że istnieje statystycznie istotny spadek (ok. 26%) zdolności cynku do hamowania wiązania liganda ($[^3\text{H}]\text{MK-801}$) do receptora NMDA w hipokampach ofiar samobójstwa. Dane te dowodzą, że zmieniona interakcja cynku z receptorem NMDA może być istotna w patofizjologii prób samobójczych [Nowak i wsp. 2003b].

Potencjalne mechanizmy przeciwdepresyjnego działania jonów cynku



Ryc. 8. Molekularny mechanizm działania cynku oraz wpływ BDNF na funkcje receptora NMDA [z Szewczyk i wsp. 2008, zmienione]

Pomimo znacznego postępu w badaniach, który osiągnięto w przeciągu ostatniej dekady, **mechanizm przeciwdepresyjnej aktywności jonów cynku nie został w pełni wyjaśniony**. Istnieje kilka potencjalnych dróg działania jonów cynku w depresji.

Coraz większa liczba badań potwierdza udział receptora NMDA w patomechanizmie i leczeniu tego schorzenia. Substancje, które hamują funkcję receptora NMDA wykazują aktywność przeciwdepresyjną w testach i modelach depresji u zwierząt [Pittenger i wsp. 2007]. **Cynk jest potencjalnym antagonistą kompleksu receptora NMDA** [Smart i wsp. 1994, Harrison i wsp. 1994], dlatego też może rozwijać swoją aktywność przeciwdepresyjną w oparciu o ten mechanizm (bezpośrednie hamowanie funkcji receptora NMDA). Klinicznie aktywne, konwencjonalne LPD, wpływające na systemy monoamin, mogą hamować funkcję receptora NMDA pośrednio, poprzez zwiększanie syntezy BDNF [Duman i wsp. 1997]. Zmniejszenie aktywności receptora NMDA wywołują też potencjalizatory AMPA i antagoniści grupy I mGluR [Pałucha i wsp. 2002]. Kolejnym możliwym mechanizmem uzyskiwania aktywności przeciwdepresyjnej przez jony cynku jest ich działanie pośrednie poprzez: antagonistyczny wpływ na receptory mGluR1 [Zirpel i wsp. 2001], wzmacnianie funkcji receptorów AMPA [Rassendern i wsp. 1990], jak też zwiększanie syntezy BDNF [Nowak i wsp. 2004, Franco i wsp. 2008], które prowadzi w rezultacie do zmniejszenia aktywności receptora NMDA.

Inny, potencjalny **mechanizm przeciwdepresyjnej aktywności jonów cynku może być związany z układem serotonergicznym**. W teście pływania u gryzoni zaobserwowano, że cynk potencjalizował działanie imipraminy (inhibitora wychwytu zwrotnego serotoniny i adrenaliny), [Krocicka i wsp. 2001, Szewczyk i wsp. 2002, Rosa i wsp. 2003]. Wyniki ostatnich doświadczeń z użyciem LPD z grupy SSRI: citalopramu i fluoksetyny oraz reboksetyny- NSRI, dowodzą, że działanie przeciwdepresyjne cynku związane jest raczej z układem serotonergicznym niż adrenergicznym. Cynk podawany wraz z reboksetyną w niskich nieaktywnych dawkach nie zmieniał zachowania zwierząt w FST, w przeciwieństwie do połączeń cynk- citalopram lub cynk- fluoksetyna (również w niskich nieaktywnych dawkach), w których znacząco obniżał czas bezruchu u testowanych zwierząt [dane niepublikowane].

Badania wykazały, że cynk **moduluje wewnątrzkomórkowe kaskady przekazywania sygnału wpływając na kinazy MAP (ang. *mitogen- activated protein kinases*), kinazę białkową C (PKC), białkowe fosfatazy tyrozynowe (PTP), kinazę białkową II zależną do wapnia i kalmoduliny (CaMK-II)**, uczestniczące w proliferacji i różnicowaniu komórek oraz ich apoptozie [Beyersmann i wsp. 2001, Li i wsp. 2003].

Klasyczne LPD takie jak fluoksetyna, imipramina i amitryptylina również modulują niektóre kinazy z rodziny MAP np. kinazę ERK1/2 (ang. *intracellular signal-regulated protein kinase 1/2*) [Fumagalli i wsp. 2005, Hisaoka i wsp. 2007]. Grupa Franco odkryła, że cynk zwiększa fosforylację kinazy ERK1/2 i wysunęła hipotezę, że to "up"-regulacja czynników neuroprotektyjnych BDNF, ERK, glutationu (GSH), odpowiada za przeciwdepresyjne właściwości tego pierwiastka śladowego [Franco i wsp. 2008]. Przez niektórych autorów cynk uważany jest nawet za wewnątrzkomórkowy drugi przekaźnik, czyli substancję, której wewnątrzkomórkowy stan jest bezpośrednio zmieniany przez zewnątrzkomórkową stymulację i w ten sposób umożliwia transdukcję sygnału zewnątrzkomórkowego w ciąg zdarzeń zachodzących wewnątrz komórki. Potwierdzają to badania zjawiska tzw. "fali cynkowej" zachodzącego w mastocytach [Yamasaki i wsp. 2007].

Innym możliwym mechanizmem molekularnego działania jonów cynku jest **antagonistyczny wpływ na kinazę-3 syntazy glikogenu (GSK-3)**. GSK-3 jest enzymem, kinazą serynowo- treoninową, który dezaktywuje syntazę glikogenu poprzez proces fosforylacji. Działanie GSK-3 nie ogranicza się jedynie do syntazy glikogenu, lecz związane jest także z wpływem na insulino- zależny czynnik wzrostu (IGF-1), czy też czynniki neurotropowe np. CREB [Ilouz i wsp. 2002, Doble i wsp. 2003, Gould i wsp. 2005]. Cynk, podobnie jak lit i magnez hamuje aktywność fosforylacyjną GSK-3 (izoforny β) w sposób bezkonkurencyjny, w stężeniach, które odnoszą się do terapeutycznej aktywności tych jonów [Ilouz i wsp. 2002]. Takie samo działanie na enzym GSK-3 wywierają LPD, ECS i niektóre leki przeciwpsychotyczne. Co więcej inhibitory GSK-3 cechują się aktywnością przeciwdepresyjną w teście pływania [Gould i wsp. 2005, Szewczyk i wsp. 2008]. Zależność pomiędzy GSK-3, CREB i BDNF jest skomplikowana. GSK-3 hamuje aktywność CREB i jest negatywnie regulowana przez BDNF, który pozostaje pod kontrolą CREB. W ten sposób hamowanie GSK-3 przez cynk prowadzi do zwiększenia aktywności CREB i BDNF, co z kolei redukuje funkcję GSK-3 (ujemne sprzężenie zwrotne). Zatem cynk zwiększa funkcję BDNF także poprzez hamowanie GSK-3 [Szewczyk i wsp. 2008].

Zaproponowano także mechanizm przeciwdepresyjnego działania cynku polegający na **interakcji receptora NMDA ze szlakami L- arginina- tlenek azotu** [Rosa i wsp. 2003]. Tlenek azotu (NO) syntezowany jest z argininy przy udziale enzymu syntazy tlenku azotu (NOS) (ang. *nitric oxide synthase*) obecnej zarówno w tkankach obwodowych (forma endotelialna), jak i w neuronach (forma neuronalna nNOS), w odpowiedzi na napływ

jonów wapnia indukowany aktywacją receptora NMDA przez glutaminian [Prast i wsp. 2001, Joca i wsp. 2006]. W układzie nerwowym NO jest neurotransmiterem, a jego udział uznaje się za istotny m.in. w patofizjologii chorób neuropsychiatrycznych takich jak: depresja, choroba afektywna dwubiegunowa czy schizofrenia [Yanik i wsp. 2004]. Poziom NO w chorobie afektywnej dwubiegunowej jest podwyższony [Savas i wsp. 2002]. Inhibitory neuronalnej odmiany NOS (nNOS) (np. ester metylowy N-nitro-L- argininy) wykazują efekt przeciwdepresyjny w FST i TST u gryzoni [Jefferys i wsp. 1996, Harkin i wsp. 1999]. Dodatkowo zaobserwowano β -adrenergiczną "down"- regulację, charakterystyczną dla LPD, po przewlekłych podaniach innego inhibitora NOS (nitro L- argininy), [Karolewicz i wsp. 1999]. Efekt ten wydaje się być rezultatem hamowania neuronalnej NOS, co potwierdzają badania z użyciem bardziej selektywnego inhibitora nNOS [Yildiz i wsp. 2000]. U pacjentów cierpiących na depresję zanotowano podwyższony poziom nitratów i zwiększoną ekspresję nNOS w hipokampie, a więc strukturze zaangażowanej w neurobiologię stresu i depresji. Dohipokampalne iniekcje antagonistów NMDA odwracają behawioralne zmiany powstałe na skutek stresu unieruchomienia (ang. *restraint stres*) i powodują efekt przeciwdepresyjny w FST u szczurów [Padovan i wsp. 2004]. Lokalne perfuzje LPD wpływającymi na układ serotonergiczny obniżają aktywność NOS w hipokampie [Joca i wsp. 2003]. Udowodniono, że cynk ma zdolność do **hamowania neuronalnej NOS** [Mittal i wsp. 1995]. W badaniach Rosa i wsp. wykazano, że użycie substratu dla NOS (L-arginina), czy też donora NO (SNAP) znosi efekt przeciwdepresyjny cynku w FST. Aktywność przeciwdepresyjna jonów cynku może być więc związana z modulacją aktywności NOS [Rosa i wsp. 2003].

MODULACJA TRANSMISJI NEURONALNEJ PRZEZ JONY CYNKU

Wpływ na pozostałe receptory dla neuroprzekaźników

Poza modulacją funkcji układu glutaminianergicznego cynk wpływa również na inne układy neuroprzekaźnikowe poprzez oddziaływanie z receptorami dla neuroprzekaźników.

Receptory GABA- budowa, funkcja i znaczenie w mechanizmie depresji

Kwas γ -aminomasłowy (GABA) jest głównym przekaźnikiem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym, obecnym w 40% wszystkich neuronów. Transmisja GABA- ergiczna występuje w interneuronach modulujących lokalną neurotransmisję, włączając neurony noradrenergiczne, dopaminergiczne i serotoninericzne.

Istnieją trzy główne klasy receptorów GABA (A, B i C). Receptory GABA_A i GABA_C należą do rodziny receptorów jonotropowych bramkowanych ligandem, podczas gdy GABA_B to receptory metabotropowe związane z białkiem G.

Receptory GABA_A tworzą heteromeryczne kanały chlorkowe o wielu miejscach modulujących [Pilc i wsp. 2005]. Dwie cząsteczki GABA muszą połączyć się z receptorem, aby kanał stał się przepuszczalny dla jonów Cl⁻. Napływ jonów chlorkowych do wnętrza neuronu powoduje miejscową hiperpolaryzację błony komórki nerwowej, co prowadzi do wzrostu progowego potencjału depolaryzacyjnego dla pobudzających neuroprzekaźników, a w konsekwencji do osłabienia gotowości komórki na pobudzenie. Większość receptorów GABA_A zbudowanych jest z dwóch podjednostek α , jednej podjednostki β oraz dwóch podjednostek γ , które są niezbędne w formowaniu miejsca wiązania dla beznodiazepin [Gąsior i wsp. 2004, Pilc i wsp. 2005].

Receptory GABA_B w ośrodkowym układzie nerwowym występują zarówno jako receptory presynaptyczne (auto- i heteroreceptory), hamując uwalnianie neuroprzekaźników z zakończeń nerwowych, jak również jako receptory postsynaptyczne, których pobudzenie przez GABA powoduje hiperpolaryzację [Bowery i wsp. 2002, Gąsior i wsp. 2004]. Receptory GABA_B wykazują najwyższą homologię z metabotropowymi receptorami dla glutaminianu. Mogą być one związane z kanałami dla K⁺ lub Ca²⁺ oraz mogą hamować produkcję cAMP. Receptory te występują jako heterodimery, zbudowane

z dwóch homologicznych podjednostek GABA_{B1} (odpowiada za wiązanie liganda) i GABA_{B2} (umiejscawia podjednostkę GABA_{B1} na powierzchni komórki, odpowiada za interakcję z białkiem G. Największe zagęszczenie receptorów GABA_B występuje we wzgórzu, korze i mózdzku [Bowery i wsp. 2002, Pilc i wsp. 2005]. Wysoki poziom ekspresji receptora GABA_B w układzie limbicznym podkreśla udział receptora w regulacji nastroju [McDonald i wsp. 2004].

Odkrycie nowych narzędzi farmakologicznych i genetycznych w ciągu ostatniej dekady pomogło w wyjaśnieniu roli receptora GABA_B w regulacji zachowań emocjonalnych. Postęp ten sprawił, że receptor GABA_B stał się celem farmakoterapii lęku i depresji.

Wielokrotne podania LPD wywołują zmiany adaptacyjne w obrębie receptora GABA_B, co wskazuje, że receptory te stanowią ważny element „**GABA- ergicznej hipotezy działania LPD**” [Pałucha i wsp. 2005, Pilc i wsp. 2005]. Stężenie GABA w płynie mózgowo- rdzeniowym i osoczu jest niższe u pacjentów cierpiących na depresję niż u pacjentów kontrolnych [Brambilla i wsp. 2003]. Co więcej, zaobserwowano obniżone stężenie GABA mierzone w korze potylicznej chorych na depresję w porównaniu z pacjentami leczonymi LPD z grupy SSRI, czy też elektrowstrząsami, u których wykazano wzrost stężenia GABA [Sanacorra i wsp. 2002, 2004].

Początkowo uważano, że substancje, które zwiększają transmisję GABA-ergiczną mogą mieć działanie przeciwdepresyjne. Hipoteza ta opierała się na odkryciu, że **baklofen** (selektywny agonista GABA_B) wykazuje działanie przeciwdepresyjne w modelu bulbektomii u szczurów, co dodatkowo dokumentowały przeciwdepresyjne efekty innych agonistów GABA_B takich jak progabina i fengabina. Ponieważ dalsze badania nad baklofenem, nie potwierdzały jego działania przeciwdepresyjnego (liczne testy i modele depresji), obecnie uważa się, że raczej długotrwałe obniżenie neurotransmisji GABA-ergicznej ma związek z działaniem przeciwdepresyjnym. Dlatego też nowych LPD poszukuje się bardziej wśród antagonistów niż agonistów receptora GABA_B [Bowery i wsp. 2002, Pilc i wsp. 2005]. Na potwierdzenie tej teorii wskazuje wiele badań między innymi fakt, że myszy „*knock-out* GABA_{B1}” wykazują aktywność przypominającą działanie LPD w teście wymuszonego pływania (FST), podobnie jak antagoniści GABA_B: CGP56433A (FST na myszach i szczurach) lub CGP55845A (FST na szczurach). Dodatkowo antagoniści receptora GABA_B między innymi CGP56433A wpływają na podniesienie poziomu BDNF w hipokampie i korze mózgowej szczura. W badaniach na gryzoniach antagoniści GABA_B (np. SGS742) wpływają na poprawę procesów poznawczych, których zaburzenia często współwystępują z chorobami afektywnymi. Efekt

przeciwdepresyjny może być również związany z interakcją receptorów GABA_B z układem serotonergicznym [Pałucha i wsp. 2005, Cryan i wsp. 2002, 2005]. Ligandy receptora GABA_B są obecnie jedną z najintensywniej badanych grup związków w kontekście ich działania przeciwdepresyjnego.

Wiele jeszcze pozostaje do wyjaśnienia biorąc pod uwagę fakt, że receptor GABA_B może występować zarówno pre- jak i postsynaptycznie, prowadząc w ten sposób w pierwszym przypadku do hamowania uwalniania GABA i pobudzenia lub wywoływać efekt hamujący w przypadku drugim. Co więcej możliwa jest również lokalizacja receptora GABA_B jako heteroreceptora na zakończeniach glutaminianergicznym oraz jego interakcja z receptorem serotonergicznym, co poszerza pole dalszych badań prowadzących do zrozumienia jego funkcji i roli w patogenezie depresji [Pilci i wsp. 2005, Cryan i wsp. 2005].

Modulacja przez jony cynku - receptor GABA_A

Wpływ cynku na receptor GABA_A został poddany szerokiej analizie przez zespół badawczy Smarta [Xie i wsp. 1993, Smart i wsp. 1994]. Metodami modelowania molekularnego zidentyfikowano **trzy miejsca wiążące** ten biometal w obrębie receptora GABA_A: pierwsze zlokalizowane jest w kanale jonowym receptora, pozostałe dwa na zewnętrznej N-końcowej części receptora w przestrzeni pomiędzy podjednostką α i β [Hosie i wsp. 2003]. Cynk hamuje receptor GABA_A w mechanizmie allosterycznym [Barberis i wsp. 2000, Hosie i wsp. 2003, Frederickson i wsp. 2005, Casagrande i wsp. 2000], który jest ściśle zależny od kompozycji podjednostek receptora. Najbardziej wrażliwa jest kombinacja podjednostek: **$\alpha 1\beta 3$** , podczas, gdy inne warianty α , β cechują się mniejszą wrażliwością na cynk. Natomiast receptory GABA_A zawierające podjednostkę γ posiadają znacznie zredukowaną wrażliwość na jony cynku [Hosie i wsp. 2003, Frederickson i wsp. 2005, Casagrande i wsp. 2003]. W rdzeniu kręgowym występują neurony, które uwalniają GABA wraz z cynkiem, a modulacja receptorów GABA_A przez cynk jest najprawdopodobniej istotnym czynnikiem w prawidłowym funkcjonowaniu mózgu [Wang i wsp. 2001]. Zmienia się ona gwałtownie podczas wczesnego rozwoju mózgu [Brooks-Kayal i wsp. 2001]. Sugeruje się również, że zmiany w modulacji receptorów GABA przez cynk mogą stanowić podłoże do rozwoju epilepsji [Coulter i wsp. 2001, Barberis i wsp. 2000].

Modulacja przez jony cynku - receptor GABA_B

W badaniach autoradiograficznych cynk w stężeniach do 100 μ M bezkompetycyjnie hamuje wiązanie liganda do receptorów GABA_B w sposób zależny od dawki. W niektórych regionach cynk moduluje wiązanie do GABA_B w sposób dwufazowy:

w stężeniach pomiędzy 10-100 μM cynk znacząco ułatwia wiązanie do GABA_B w hipokampie i w mózdzku, ale nie we wzgórzu [Turgeon i wsp. 1992]. Kolejne badania potwierdzają, że cynk pełni funkcję endogennego neuromodulatora. Wydaje się, że jon ten ułatwia powstawanie IPSP (postsynaptycznych potencjałów hamujących) poprzez zwiększenie pobudliwości interneuronów hamujących, zwiększając w ten sposób uwalnianie GABA [Zhou i wsp. 1993].

Wpływ cynku na transportery dla neuroprzekaźników

Wiele chorób psychiatrycznych, neurologicznych i neurodegeneracyjnych wiąże się ze zmianami w kaskadzie neurotransmisji. W rzeczywistości duża liczba środków farmakologicznych wchodzi w **reakcje z transporterami dla neuroprzekaźników, działając głównie jako ich inhibitory**. Szczególnie dobrze ilustrują to antydepresanty i psychostymulanty, które działają poprzez zahamowanie transporterów dla monoamin [Masson i wsp. 1999]. Jony cynku mają zdolność modulacji wychwytu neuroprzekaźników związanych z określonymi grupami transporterów.

Transporter dopaminy

Wyniki badań na mózgach szczurzych wskazują, że cynk wpływa na wychwyt dopaminy [Richfield 1993]. Transporter dopaminy (DAT) zlokalizowany jest presynaptycznie w zakończeniach nerwowych i reguluje ilość dostępnej dopaminy w synapsie poprzez uczestnictwo w szybkim wychwycie uwolnionej dopaminy. DAT uważany jest za specyficzny marker neuronów dopaminergicznych. Jest on głównym punktem uchwytu środków psychostymulujących o działaniu uzależniającym takich jak kokaina i amfetamina [Norregaard i wsp. 1998, Masson i wsp. 1999].

Ludzki transporter dopaminy (hDAT) posiada endogenne miejsce wiążące jony cynku z trzema miejscami koordynacyjnymi na jego zewnątrzkomórkowej powierzchni (His 193, His 375 i Glu 396) [Scholze i wsp. 2002, Norregaard i wsp. 1998, Loland i wsp. 2004]. W stężeniach mikromolarnych Zn^{2+} **działa jako potencjalny, niekompetycyjny bloker wychwytu dopaminy** w komórkach COS (komórki nerki małpy) z ekspresją hDAT (dwufazowo hamuje wychwyt [3H]dopaminy; $K_i=0.8 \mu\text{M}$ i $K_i>1000 \mu\text{M}$). W przeciwieństwie do tego Zn^{2+} **potencjalizuje działanie analogu kokainy**: WIN 35,428. Co ciekawe efekty te nie były obserwowane w blisko związanym ludzkim transporterze

noradrenaliny (hNAT). Ponieważ jony cynku nie zapobiegają wiązaniu dopaminy, ale hamują jej translokację sugeruje się, iż Zn^{2+} może ograniczać zmiany konformacyjne kluczowe dla procesów transportu [Norregaard i wsp. 1998]. Tak więc blokowanie wewnętrznego transportu przez cynk nie zależy od prostej inhibicji obrotu transportera [Scholze i wsp. 2002]. Wyniki ostatnich badań sugerują, że cynk ułatwia przewodnictwo jonów chlorkowych przez hDAT, dzięki czemu posiada zdolność modulowania potencjału błonowego w komórkach z ekspresją DAT, co w efekcie powoduje jednoczesne hamowanie wychwytu i wzmocnienie wpływu neuroprzekaźnika [Meinild i wsp. 2004].

Transportery dla GABA

Transportery dla kwasu γ -aminomasłowego (GATs) odgrywają istotną rolę w neurotransmisji hamującej poprzez oczyszczanie synaptycznie uwolnionego GABA oraz utrzymywanie niskiego, stałego poziomu GABA w synapsie oraz regionach pozasynaptycznych [Cohen- Kfir i wsp. 2005]. U ssaków zidentyfikowano cztery izoformy transporterów dla GABA: GAT1, GAT2, GAT3 i GAT4. GAT1 i 4 są pierwotnie zlokalizowane w centralnym systemie nerwowym, szeroko rozpowszechnione w mózgu i rdzeniu kręgowym. Szczególnie gęste rozmieszczenie GAT4 odkryto w obszarze CA1 i CA3 hipokampa. GAT1 i GAT4 ze względu na ich obfitość i kolokalizację z synapsami GABA są uważane za główne czynniki regulujące neurotransmisję GABA-ergiczną w układzie nerwowym [Cohen- Kfir i wsp. 2005, Masson i wsp. 1999].

Zbadano, że w stężeniach odpowiadających fizjologicznym, **cynk silnie hamuje GAT4**. Kolokalizacja transportera GAT4 i zakończeń glutamatergicznych zawierających cynk w rejonie CA1 i CA3 hipokampa wskazują na funkcję cynku jako istotne, potencjalne połączenie neuromodulujące pomiędzy pobudzającą a hamującą neurotransmisją. W ten sposób, przez blokowanie wychwytu GABA, cynk uwalniany łącznie z glutaminianem może ułatwiać hamującą transmisję GABA-ergiczną. Działanie to z kolei może odgrywać rolę ochronną przeciwko indukowanej glutaminianem ekscytotoksyczności w podatnych na wyładowania neuronach hipokampa. Tak więc cynk pełni **funkcję neuroprotekcyjną**, tak jak wszystkie środki odwracające aktywność GAT [Cohen- Kfir i wsp. 2005, Masson i wsp. 1999].

Transportery aminokwasów pobudzających

Wiadomo, że komórki nerwowe mogą ulegać zniszczeniu pod wpływem ekspozycji na wysokie stężenia glutaminianu. Neurotoksyczność ta spowodowana jest nadstymulacją kanału jonowego tego receptora prowadzącą do nadmiernie wysokiego poziomu wapnia w komórkach nerwowych [Masson i wsp. 1999]. Podniesiony poziom glutaminianu

w przestrzeni zewnątrzkomórkowej ma związek z patofizjologią wielu chorób neurodegeneracyjnych takich jak: pląsawica Huntingtona czy choroba Alzheimera. Co więcej, wykazano, że glutaminian jest odpowiedzialny za poważne uszkodzenia powstające podczas urazów mózgu, udarów, niedokrwienia, niedotlenienia i stanu padaczkowego [Masson i wsp. 1999]. Transportery dla aminokwasów pobudzających utrzymują zewnątrzkomórkowe stężenie glutaminianu poniżej poziomu toksycznego oraz regulują kinetykę aktywacji receptora dla glutaminianu [Vandenberg i wsp. 1998, Vandenberg i wsp. 2004]. Poznano do tej pory pięć ludzkich transporterów dla glutaminianu: EAAT1-5. EAAT1 jest szczególnie obecny w korze mózdzku, podczas gdy obszarem zawierającym najwyższe poziomy EAAT2 są kora mózgu, hipokamp, przegroda, wzgórze, prążkowie, jądro półleżące przegrody oraz mózdzek [Masson i wsp. 1999].

Grupa badawcza Spiridiona wykazała, że **cynk hamuje transport glutaminianu** w komórkach Müllera i czopkach siatkówki salamandry. Efekty działania cynku były gwałtowne i w pełni odwracalne, co sugerowało, że cynk łączy się bezpośrednio z transporterem. Nie wydaje się on współzawodniczyć z glutaminianem, sodem, potasem lub protonami w wiązaniu do transportera, co wskazuje na zdolność do allosterycznej modulacji jego funkcji. Dodatkowo cynk różnorodnie moduluje aktywność związanego z transporterem kanału chlorkowego. W komórkach Müllera jony cynku stymulują aktywność kanału chlorkowego podczas gdy w czopkach siatkówki hamują kanał chlorkowy [Spiridon i wsp. 1998].

Zespół naukowy Vandenberg zbadął wpływ jonów cynku na dwa, najszerzej występujące ludzkie transportery dla aminokwasów pobudzających: EAAT1 i EAAT2. Okazało się, że **cynk działa jako niekompetycyjny, częściowy inhibitor transportera EAAT1** (wartość $IC_{50}=9.9\pm 2.3 \mu M$), nie zmieniając przewodnictwa chlorków. Nie ma on natomiast wpływu na EAAT2 w stężeniach sięgających do $300 \mu M$. Badania molekularne wykazały, że za różnicę tą odpowiadają miejsca histydynowe wiążące cynk w pozycji 146, obecne w obydwu transporterach oraz w pozycji 156, które w EAAT2 zajmuje glicyna [Vandenberg i wsp. 1998, 2004]. Podobnie wiąże się cynk do EAAT4. Miejsce wiążące dla cynku jest odległe od miejsc wiążących dla glutaminianu czy protonów. Badania Mirtovica potwierdziły, iż cynk nie wiąże się z EAAT2 i 3, lecz wiąże się z EAAT4 i selektywnie hamuje przewodnictwo chlorkowe, z niewielkim wpływem na sam transport glutaminianu [Mitrovic i wsp. 2001]. Poprzez oddziaływanie na transportery dla glutaminianu cynk może odgrywać rolę neuromodulującą podczas transmisji synaptycznej

oraz neuroprotekcijną podczas stanów niedokrwiennych [Vandenberg i wsp. 1998, 2004, Spiridon i wsp. 1998].

Transportery glicyny

Aminokwas glicyna, wraz z glutaminianem jest koagonistą, receptora NMDA, jak również agonistą hamujących, wrażliwych na strychninę receptorów glicynowych. Zidentyfikowano dwa transportery o wysokim powinowactwie dla glicyny: GLYT1 i GLYT2, każdy w kilku alternatywnych izoformach, regulujące synaptyczne stężenia glicyny. Podtyp GLYT1 występuje w komórkach glejowych mózgu i rdzenia kręgowego, w sąsiedztwie zarówno pobudzających synaps glutaminianergicznych, jak i hamujących synaps glicynergicznych. Ekspresję podtypu GLYT2 obserwuje się w hamujących neuronach glicynergicznych rdzenia kręgowego i pnia mózgu. Sugeruje się, że GLYT1 jest odpowiedzialny za regulację stężenia glicyny w synapsach pobudzających, podczas gdy kombinacja podtypów GLYT1 i 2 wykorzystywana jest w hamujących synapsach glicynergicznych [Ju i wsp. 2004, Masson i wsp. 1999, Betz i wsp. 2006].

Grupa badawcza Ju sprawdzała działanie jonów cynku na transportery dla glicyny: GLYT1b oraz GLYT2a w oocytach *Xenopus laevis*. Wyniki badań wykazały, że **cynk jest niekompetycyjnym inhibitorem GLYT1, nie ma natomiast wpływu na GLYT2**. Wartości IC_{50} dla hamowania transportu glicyny oraz hamowanie wychwytu [3H]glicyny przez cynk wynoszą odpowiednio 9.7 i 11 μM , co mieści się w granicach przewidywanych stężeń wolnego, zewnątrzkomórkowego cynku w mózgu. Zidentyfikowano również dwa miejsca histydynowe: His -243 i His-410, jako koordynujące miejsca wiążące cynk na GLYT1b [Ju i wsp. 2004].

Sugeruje się, że GLYT1b może stanowić wrażliwy cel dla cynku uwalnianego synaptycznie, a modulacja transportera może nieść ze sobą ważne fizjologiczne i patologiczne następstwa. Udowodniono ostatnio, że stężenia glicyny w synapsach pobudzających nie są wystarczające do wysycenia miejsca glicynowego receptora NMDA oraz, że transporter GLYT1 może skutecznie kontrolować modulację funkcji receptora NMDA przez glicynę. Dlatego wydaje się interesujące zbadanie, czy regulacja aktywności transportera GLYT1 przez cynk odgrywa istotną rolę w kształtowaniu dynamiki pobudzającej neurotransmisji mediowanej przez NMDA [Ju i wsp. 2004].

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było **określenie mechanizmów przeciwdepresyjnego działania jonów cynku** poprzez:

- - zbadanie wybranych zmian adaptacyjnych, zachodzących pod wpływem jonów tego biometalu oraz porównanie tych zmian z efektami wywołanymi przez klasyczne leki przeciwdepresyjne
- - zbadanie roli układów glutaminianergicznego i serotonergicznego w mechanizmie działania przeciwdepresyjnego jonów cynku w teście wymuszonego pływania.

Cel pracy zrealizowano przez:

1. Badanie wpływu cynku na **receptory α_1 , α_2 , β_1 - adrenergiczne** w korze mózgowej myszy.
2. Badanie wpływu cynku na **kompleks receptora NMDA** (miejsce glicynowe) w korze mózgowej szczura.
3. Badanie wpływu cynku na **receptory serotonergiczne $5HT_{1A}$ i $5HT_{2A}$** w hipokampie i korze mózgowej szczura.
4. Badanie wpływu cynku na **receptory mGluR5 grupy I** w korze mózgowej szczura.
5. Badanie roli układu serotonergicznego i glutaminianergicznego w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania cynku w **teście wymuszonego pływania** u myszy i szczurów.

MATERIAŁY I METODY

ZWIERZĘTA

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach- samcach, szczepu Wistar, z hodowli Wydziału Farmaceutycznego UJCM, kod: krf: WI(WU) o masie 200-250 g oraz na myszach szczepu Albino Swiss CD10, z hodowli M. Staniszevska (Kielce), o masie 20-25 g. Zwierzęta przetrzymywano w klimatyzowanych pomieszczeniach o stałej temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, w standardowych klatkach plastikowych (4-6 szczurów lub 10-15 myszy na klatkę), z zachowaniem naturalnego, 12-godzinnego cyklu dobowego światło/noc oraz wolnym dostępem do wody i suchej karmy granulowanej. Związki podawano między godzinami: 9.00 a 11.00. Testy behawioralne przeprowadzono pomiędzy godziną 9.00 a 14.00. Wszystkie doświadczenia przeprowadzone były za zgodą komisji bioetycznej ds. badań na zwierzętach.

SCHEMAT PODAWANIA ZWIĄZKÓW

W eksperymentach nad wpływem przewlekłych podań związków na powstawanie zmian adaptacyjnych związki podawano dootrzewnowo (*i.p.*) w objętości 10 ml/kg u myszy lub 2 ml/kg u szczurów, raz dziennie o stałej porze. Zwierzęta kontrolne otrzymywały odpowiednio 0,9% wodny roztwór NaCl. Nazwy, dawki i pochodzenie stosowanych związków opisano przy poszczególnych eksperymentach.

W testach behawioralnych po podaniach jednorazowych u myszy badane związki podawano zwierzętom dootrzewnowo (*i.p.*) w objętości 10 ml/kg. Stosowane dawki substancji oraz przedziały czasowe podano przy opisie poszczególnych procedur w szczegółowej części metodyki. Zwierzęta z grup kontrolnych otrzymywały odpowiednie objętości 0,9% roztworu chlorku sodu. Zwierzęta z grup badanych otrzymywały podania dwóch związków w odstępie 15 minutowym. 45 minut później wykonywano test pływania.

W testach behawioralnych po podaniach subchronicznych u szczurów badane związki podawano dootrzewnowo (*i.p.*) w objętości 2ml/kg masy ciała. Zwierzęta z grup kontrolnych otrzymywały odpowiednie objętości 0,9% roztworu chlorku sodu. Związki podawano szczurom trzykrotnie: 24 godziny, 5 godzin i 1 godzinę przed testem pływania. Grupy liczyły po 8-14 osobników.

BADANIA BIOCHEMICZNE

Analizy radioreceptorowe – pobieranie i przechowywanie tkanek do oznaczeń receptorowych

Doświadczenia przeprowadzono po przewlekłych (14 dni) podaniach imipraminy w dawce 15 mg/kg masy ciała oraz wodorooasparaginianu cynku w dawce 65 mg/kg masy ciała (w przeliczeniu 11.5 mg cynku/kg masy ciała; dawki aktywne we wcześniejszych eksperymentach). Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały sól fizjologiczną. Po dwóch tygodniach, 24 godziny od podania ostatniej dawki zwierzęta dekapitowano. Wyizolowano korę nową i hipokampy, które zamrażano na suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -70 °C przez okres od dwóch do sześciu tygodni do czasu oznaczeń.

Analizy radioreceptorowe - substancje podawane zwierzętom:

- imipramina (chlorowodorek, Polfa, Polska)
- cynk (wodorooasparaginian, Farmapol, Poznań, Polska).

Wiązanie [³H]Prazosyny do receptora α_1 w korze mózgowej myszy

Przygotowanie tkanki

Korę mózgową homogenizowano w 10 ml 50 mmol/l buforu Tris-HCl o pH 7.6 i wirowano przez 20 min (20 000 x g) w temp. 0-4 °C. Otrzymany pelet homogenizowano w tej samej objętości buforu i ponownie wirowano przez 20 min. (20 000xg) w temp. 0-4 °C. Ostateczny pelet zawieszono w buforze Tris-HCl w proporcji 1g tkanki na 35 ml buforu.

Procedura oznaczenia

Mieszanina inkubacyjna zawierała 240 μ l zawiesiny tkankowej, 30 μ l buforu i 30 μ l, 0,2 nM lub 1 nM [3H]Prazosyny. Wiązanie niespecyficzne oznaczano przy pomocy 30 μ l 10 μ M fentolaminy. Próbkę w dwukrotnych powtórzeniach inkubowano w temperaturze 30 °C przez 30 min. Doświadczenie przeprowadzano na płytkach Millipore MAFCNOB 10. Inkubację przerywano poprzez filtrację (urządzenie filtracyjne, Millipore) przez filtry Glass Fiber Type C płuczając dwukrotnie 100 μ l lodowatego buforu. Filtry umieszczano w naczynkach scyntylicyjnych i zalewano płynem scyntylicyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym WALLAC 1409 DSA. Wyniki opracowywano przy użyciu programu GraphPAD/Prism, Version 3.0 – San Diego, CA, USA.

Wiązanie [³H]Klonidyny do receptora α_2 w korze mózgowej myszy

Przygotowanie tkanki

Korę mózgową homogenizowano w 20 objętościach 50 mmol/l buforu Tris-HCl o pH 7.6 i wirowano przez 10 minut z prędkością 1000 x g w temp. 0-4 °C. Zebrany supernatant wirowano następnie przez 20 min z prędkością 20 000 x g. Otrzymany pelet homogenizowano ponownie w tej samej objętości buforu i inkubowano przez 15 min. w temp. 37 °C a następnie wirowano przez 20 min. (20 000 x g w temp. 0 °C). Ostateczny pelet zawieszono w buforze Tris-HCl w proporcji 1 g tkanki na 35 ml buforu.

Procedura oznaczenia

Mieszanina inkubacyjna zawierała 240 μ l zawiesiny tkankowej, 30 μ l buforu i 30 μ l, 2 nM lub 10 nM [3H] Klonidyny. Wiązanie niespecyficzne oznaczano w obecności 10 μ M klonidyny. Próbkę w dwukrotnych powtórzeniach inkubowano na płytkach MAFCNOB 10, Millipore przez 25 min. w temp. 30 °C. Inkubację przerwano poprzez filtrację (E-DOS, Zeiss) przez filtry Whatman GF/C płuczając dwukrotnie 100 μ l buforu. Filtry umieszczano w naczynkach scyntylicyjnych i zalewano płynem scyntylicyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym WALLAC 1409 DSA. Wyniki opracowywano przy użyciu programu GraphPAD/Prism, Version 3.0 – San Diego, CA, USA.

Wiązanie [³H]CGP 12177 do receptora β_1 w korze mózgowej myszy

Przygotowanie tkanki

Korę mózgową homogenizowano w 50 mmol/l buforze Tris-HCl o pH 7.6, w proporcji 1 g tkanki na 30 ml buforu i wirowano przez 10 minut z prędkością 1000 x g w temp. 4 °C. Zebrano supernatant i wirowano go z prędkością 20 000 x g przez 20 minut. Otrzymany pelet ponownie homogenizowano w takiej samej objętości buforu i wirowano przez 20 minut z taką samą prędkością. Ostateczny pelet zawieszono w buforze Tris-HCl w proporcji 1 g tkanki na 35 ml buforu.

Procedura oznaczenia

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 240 μ l zawiesiny tkankowej, 30 μ l [³H] CGP 12177 w stężeniu 0,2 nM lub 1 nM oraz 30 μ l buforu do oznaczenia wiązania całkowitego lub 30 μ l 10 μ M propranololu do oznaczenia wiązania niespecyficznego. Całkowita objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 0,3 ml. Inkubację przeprowadzono na płytkach Millipore MAFCNOB 10. Próbki w dwukrotnych powtórzeniach inkubowano w temp. 37 °C przez 60 minut. Inkubację przerywano poprzez filtrację na filtrach Millipore Type C. Filtry płukano dwukrotnie 100 μ l lodowatego buforu, umieszczano w naczynkach i zalewano płynem scyntylicyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym WALLAC 1409 DSA. Wyniki opracowywano przy użyciu programu GraphPAD/Prism, Version 3.0 – San Diego, CA, USA.

Wiązanie [³H]8-OH-DPAT do receptora 5-HT_{1A} w hipokampie szczura

Przygotowanie tkanki

Tkanekę (hipokamp) homogenizowano w 4 ml 50 mmol/l buforu Tris-HCl o pH 7.7, a następnie wirowano przez 10 minut z prędkością 20 000 x g w temp. 4 °C. Otrzymany pelet ponownie homogenizowano w takiej samej objętości buforu i inkubowano przez 10 minut w temp. 37 °C. Po tym czasie zawiesinę odwirowano z prędkością 20 000 x g przez 10 min. Otrzymany pelet homogenizowano i zawieszono ostatecznie w buforze

ostatecznym w proporcji 5 mg tkanki w 1 ml mieszaniny inkubacyjnej. Bufor ostateczny zawierał kwas askorbinowy w stężeniu 0,1%, CaCl₂ w stężeniu 4 mM, oraz pargylinę w stężeniu 10 μM.

Procedura oznaczenia

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 750 μl zawiesiny tkankowej, 75 μl [3H]8-OH-DPAT stężeniach od 1,3 do 14 nM (5 stężeń) oraz 75 μl buforu Tris-HCl lub 10 μM serotoniny. Całkowita objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 0,9 ml. Inkubację prowadzono w probówkach w temp. 37 °C przez 20 min. Inkubację przerwano filtrując mieszaninę przez filtry GF/B za pomocą urządzenia filtrującego Harvester i dwukrotnego przepłukania objętością 4 ml lodowatym buforem. Filtry umieszczono w naczynkach i zalano płynem scyntylicyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym WALLAC 1409 DSA. Stężenia białka w zawieszynie tkankowej określono przy użyciu zestawu do oznaczania białka firmy Sigma (BSA protein assay/kit). Maksymalne wiązanie (B_{max}) obliczano przy użyciu programu komputerowego GraphPAD Prism 3.0. Zostało ono przedstawione w fmol/mg białka.

Wiązanie [³H]Ketanseryny do receptora 5-HT_{2A} w korze mózgowej szczura

Przygotowanie tkanki

Korę mózgową homogenizowano w 8 ml buforu (50 mmol/l) Tris-HCl o pH 7.7, a następnie wirowano przez 20 minut (20 000 x g) w temp. 4 °C. Pelet homogenizowano ponownie w obj. 6 ml buforu i inkubowano przez 10 min. w 37 °C. Po inkubacji zawiesinę odwirowano (20 minut 20 000 x g). Otrzymany pelet ostateczny zhomogenizowano i zawieszono w buforze w proporcji 9 mg tkanki na 1 ml mieszaniny inkubacyjnej.

Procedura oznaczenia

Mieszanina inkubacyjna zawierała 500 μl zawiesiny tkankowej, 50 μl buforu i 50 μl, [3H] Ketanseryny- sześć stężeń: od 0,5 do 6 nM. Wiązanie niespecyficzne oznaczano przy pomocy 50 μl 10 μM mianseryny. Inkubację prowadzono w probówkach w temperaturze 37 °C przez 20 minut. Inkubację przerwano przez filtrację na filtrach GF/B za pomocą urządzenia Harvester i dwukrotnie płukano lodowatym buforem w objętości 4 ml. Filtry umieszczono w naczynkach i zalewano płynem scyntylicyjnym. Radioaktywność

mierzono w liczniku scyntylicyjnym WALLAC 1409 DSA. Stężenia białka w zawiesinie tkankowej określono przy użyciu zestawu do oznaczania białka firmy Sigma (BSA protein assay/kit). Wartości B_{max} (wiązanie maksymalne) oraz K_D (powinowactwo) wyznaczono przy pomocy programu komputerowego GraphPAD Prism 3.

Wiązanie [³H]MPEP do receptora mGluR5 w korze mózgowej i hipokampie szczura

Przygotowanie tkanki

Korę mózgową homogenizowano w objętości 8 ml 50 mmol/l buforu Tris-HCl o pH 7.5 przygotowanym na 0,9% roztworze NaCl. Następnie wirowano przez 20 minut z prędkością 20 000 x g w temp. 4 °C. Pelet ponownie zhomogenizowano, zawieszono w takiej samej objętości buforu i wirowano przez 20 minut (20 000 x g). Ostateczny pelet homogenizowano i zawieszono w buforze w proporcji 8 mg tkanki na 1 ml mieszaniny inkubacyjnej.

Procedura oznaczenia

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 500 µl zawiesiny tkankowej, 50 µl [³H] MPEP w (sześć stężeń: od 2 nM do 35 nM) oraz 50 µl buforu (wiązanie całkowite) lub 50 µl 10 µM MTEP (wiązanie niespecyficzne). Całkowita objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 0,6 ml. MTEP rozpuszczono w buforze z DMSO w stosunku 1:40. Inkubację prowadzono w probówkach przez 45 minut w temperaturze 25 °C. Inkubację przzerwano przez filtrację urządzeniem Harvester na filtrach GF/B i dwukrotnie płukano lodowatym roztworem buforu. Filtry zalewano w naczynkach płynem scyntylicyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym WALLAC 1409 DSA. Stężenia białka w zawiesinie tkankowej określono przy użyciu zestawu do oznaczania białka firmy Sigma (BSA protein assay/kit). Wartości B_{max} (wiązanie maksymalne) oraz K_D (powinowactwo) wyznaczono przy pomocy programu komputerowego GraphPAD Prism 3.0.

Wiązanie [³H]L-689 560 do miejsca glicynowego kompleksu receptora NMDA w korze mózgowej szczura

Przygotowanie tkanki

Korę mózgową homogenizowano w dwudziestokrotnej objętości 50 mmol/l buforu Tris-HCl o pH 7.6. Tkanekę wirowano i homogenizowano czterokrotnie przez 20 min. z prędkością 20 000 x g w temperaturze 4 °C. Ostateczny pelet zawieszono w buforze w proporcji 12 mg tkanki na 1 ml zawiesiny tkankowej.

Procedura oznaczenia

Pierwsza mieszanina inkubacyjna zawierała: 230 µl zawiesiny tkankowej, 30 µl 1nM [³H]L-689 560, 10 µl buforu. Druga mieszanina inkubacyjna zawierała: 230 µl zawiesiny tkankowej, 30 µl 1nM [³H]L-689 560, 10 µl 500 µM roztworu wodorooasparagianu cynku. Trzecia mieszanina inkubacyjna zawierała: 230 µl zawiesiny tkankowej, 30 µl 1nM [³H]L-689 560, 10 µl 1000 µM roztworu wodorooasparagianu cynku. Do mieszanin inkubacyjnych dodawano kolejno wzrastające stężenia (od 10⁻⁴ do 10⁻¹⁰) roztworu glicyny w objętości 30 µl. Wiązanie niespecyficzne oznaczono w obecności 1mM roztworu glicyny. Inkubacja została przeprowadzona na płytkach Millipore/Multiscreen MAFCNOB 10. Próbkę w dwukrotnych powtórzeniach inkubowano przez 60 minut w temp. 4 °C. Inkubację przerwano przez filtrację (urządzenie flitrujące Millipore) na filtrach Whatman GF/C płuczac dwa razy po 100 µl zimnego buforu. Filtry umieszczono w naczynkach scyntylicyjnych i zalewano płynem scyntylicyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym WALLAC 1409 DSA. Wyniki opracowano przy użyciu programu GraphPAD/Prism.

BADANIA BEHAWIORALNE

Stosowane związki

- imipramina (chlorowodorek, Polfa, Polska) rozpuszczona w soli fizjologicznej, podawana dootrzewnowo (*i.p.*)
- cynk (wodoroasparaginian, Farmapol, Poznań, Polska) rozpuszczony w soli fizjologicznej, podawany dootrzewnowo (*i.p.*)
- NMDA (Sigma, Steinheim, Niemcy) rozpuszczony w soli fizjologicznej, podawany dootrzewnowo (*i.p.*)
- L-701,324 (Sigma) rozpuszczony w 1% wodnym roztworze Tweenu 80, podawany dootrzewnowo (*i.p.*)
- CGP 37849 (Ciba-Geigy, Bazylea, Szwajcaria), rozpuszczony w soli fizjologicznej, podawany dootrzewnowo (*i.p.*)
- MK-801 (Sigma) rozpuszczony w soli fizjologicznej, podawany dootrzewnowo (*i.p.*)
- WAY 100635 (zsyntetyzowany przez Dr J. Boksa IF PAN, Kraków) rozpuszczony w soli fizjologicznej, podawany podskórnio (*s.c.*)
- Ritanseryna (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK) rozpuszczona w mieszaninie DMSO/soli fizjologicznej w stosunku 1:250, podawana dootrzewnowo (*i.p.*)
- NBQX (Tocris House, Bristol, UK) rozpuszczony w soli fizjologicznej, podawany dootrzewnowo (*i.p.*)
- Fluoksetyna (Sigma) rozpuszczona w soli fizjologicznej, podawana dootrzewnowo (*i.p.*)
- CX 614 (Cortexpharm, USA) rozpuszczona w soli fizjologicznej, podawana dootrzewnowo (*i.p.*)

Test wymuszonego pływania (FST) u myszy

Test wymuszonego pływania, zwany testem rezygnacji, u myszy wykonywano wg metody opisanej przez Porsolta i wsp. 1977. Zgodnie z tą metodą myszy umieszczano

pojedynczo w szklanych cylindrach o wysokości 25 cm i średnicy 10 cm wypełnionych do wysokości 10 cm wodą o temperaturze 25°C. Myszy pozostawiano w wodzie na czas 6 minut. Po upływie pierwszych dwóch minut mierzono czas bezruchu przez ostatnie 4 minuty testu. Za bezruch przyjęto stan, w którym myszy zmuszone do pływania na ograniczonej przestrzeni, po okresie energicznej aktywności związanej z próbami wydostania się, przyjmują charakterystyczną, semihoryzontalną postawę (beZRUCH- ang. *immobility*) oraz wykonują jedynie niezbędne ruchy umożliwiające utrzymanie głowy tuż nad powierzchnią wody.

Test wymuszonego pływania (FST) u szczurów

Test wymuszonego pływania u szczurów przeprowadzono według metody Porsolta [Porsolt i wsp. 1978]. Zwierzęta umieszczano w szklanych cylindrach o wysokości 40 cm i średnicy 20 cm, wypełnionych wodą, o temperaturze 25°C, do wysokości 30 cm. Przeprowadzono dwie sesje pływania: pierwotny, 15 minutowy pretest oraz 5 minutowy test właściwy wykonany 24 godziny później. Behawior zwierząt oceniano według metody Detke [Detke i wsp. 1995] podczas 5 minutowego testu właściwego. Zliczano czasy następujących zachowań: czas bezruchu (kiedy szczury pasywnie dryfowały wykonując jedynie ruchy pozwalające utrzymać głowę tuż nad powierzchnią wody), czas pływania (kiedy szczury wykonywały aktywne ruchy pływania), czas wspinania (kiedy szczury wykonywały aktywne ruchy przy użyciu czterech kończyn w wodzie i ponad nią, skierowane zazwyczaj w kierunku ścianek cylindra, w celu wydostania się z naczynia).

A. Badanie dawko- zależności działania przeciwdepresyjnego cynku

Zwierzęta losowo przydzielono do jednej z pięciu grup. Każda z grup liczyła 8 - 12 osobników. 45 minut przed wykonaniem testu myszom podano:

- Gr. 1- sól fizjologiczną – grupa kontrolna
- Gr. 2- cynk w dawce 2.5 mg/kg m.c.
- Gr. 3- cynk w dawce 5 mg/kg m.c.
- Gr. 4- cynk w dawce 10 mg/kg m.c.

B. Badanie udziału układów glutamatergicznego i serotoninergicznego w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku u myszy

Zwierzęta losowo przydzielono do jednej z liczących 8 - 12 osobników grup. Godzinę przed testem zwierzęta otrzymały pierwsze podanie badanych związków, bądź soli fizjologicznej (grupa kontrolna), a po upływie 15 minut kolejne wg podanego poniżej schematu:

- Sól fizjologiczna + sól fizjologiczna
- Cynk w dawce 5 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- Cynk w dawce 2.5 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- Ritanseryna w dawce 4 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- Ritanseryna w dawce 4 mg/kg m.c. + cynk w dawce 5 mg/kg m.c.
- WAY 100635 w dawce 0,3 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- WAY 100635 w dawce 0,3 mg/kg m.c. + cynk w dawce 5 mg/kg m.c.
- Fluoksetyna w dawce 5 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- Fluoksetyna w dawce 5 mg/kg m.c. + cynk w dawce 2.5 mg/kg m.c.
- NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. + cynk w dawce 5 mg/kg m.c.
- L 701324 w dawce 1 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- L 701324 w dawce 1 mg/kg m.c. + cynk w dawce 2.5 mg/kg m.c.
- CGP 37849 w dawce 0.3 mg/kg m.c. + cynk w dawce 2.5 mg/kg m.c.
- MK-801 w dawce 0.05 mg/kg m.c. + cynk w dawce 2.5 mg/kg m.c.
- NBQX w dawce 10 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- NBQX w dawce 10 mg/kg m.c. + cynk w dawce 5 mg/kg m.c.
- CX 614 w dawce 1 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- CX 614 w dawce 1 mg/kg m.c. + cynk w dawce 2.5 mg/kg m.c.

C. Badanie udziału komponenty serotoninergicznej i glutaminianergicznej w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku u szczurów

Zwierzęta losowo przydzielono do jednej z liczących 8-14 osobników grup. Te same związki podawano trzykrotnie: 24 godziny, 5 godzin i 1 godzinę przed testem w następujących dawkach i schematach:

- Sól fizjologiczna + sól fizjologiczna

- Cynk w dawce 5 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- Fluoksetyna w dawce 20 mg/kg m.c. + sól fizjologiczna
- NMDA w dawce 75 mg/kg m.c.+ sól fizjologiczna
- NMDA w dawce 75 mg/kg m.c.+ cynk w dawce 5 mg/kg m.c.

Test spontanicznej aktywności lokomotorycznej u myszy

Badanie ruchliwości spontanicznej u myszy wykonywano metodą fotoopornikową, w specjalnie skonstruowanych klatkach - aktometrach o średnicy 25 centymetrów, przez które przebiegają dwie prostopadłe wiązki promieni świetlnych, padające na odpowiednie fotooporniki. Badane związki podawano zwierzętom zachowując dawki, odstępy czasu oraz liczebność w grupach tak, jak w teście wymuszonego pływania. Zwierzęta umieszczano w aktometrach pojedynczo. Aktywność lokomotoryczną mierzono przez 30 minut. Każde przerwanie promienia świetlnego przez poruszające się zwierzę rejestrowano za pomocą odpowiednich liczników i oceniano jako aktywność lokomotoryczna. Ilość impulsów, generowanych ilością ruchów przecinających wiązkę światła, odczytywano po upływie: 2, 4, 6, 10, 15, 20 i 30 minut. Test aktywności lokomotorycznej wykonano tylko dla dawek działających w teście wymuszonego pływania.

Test spontanicznej aktywności lokomotorycznej jest konieczny do oceny fałszywie dodatnich wyników testu Porsolta. Skrócenie czasu bezruchu w teście wymuszonego pływania połączone ze wzmożoną ruchliwością zwierząt w teście aktywności lokomotorycznej nie jest uznawane za efekt przeciwdepresyjny.

Analizy statystyczne

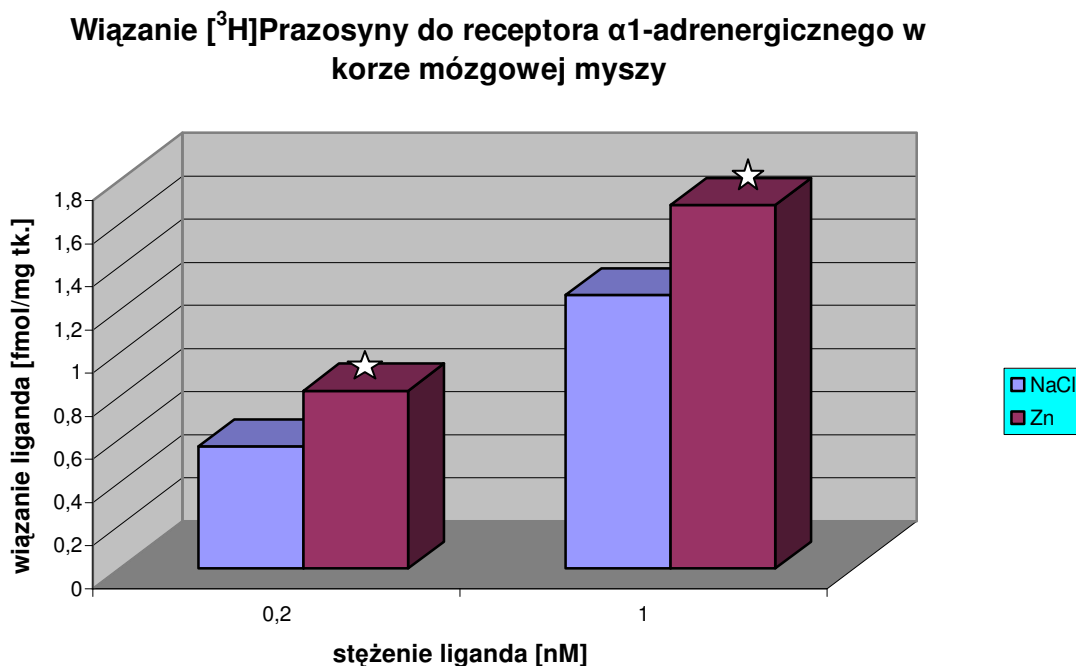
Do oceny statystycznej wyników stosowano test t- Studenta oraz analizę wariancji (ANOVA) jedno- lub dwu-czynnikową.

WYNIKI

BADANIA BIOCHEMICZNE - RADIORECEPTOROWE

Analiza dwupunktowa wiązania [³H]Prazosyny do receptora α_1 -adrenergicznego w korze mózgowej myszy

Wodoroasparaginian cynku podawany myszom przez okres dwóch tygodni w dawce 65 mg/kg masy ciała (11.5 mg cynku/kg m.c.) spowodował znamienny wzrost wiązania liganda [³H]Prazosyny do receptorów α_1 -adrenergicznych w obu zastosowanych stężeniach liganda: 0,2 i 1 nM kolejno o 46% i 33% (Rycina 9, Tabela 2).



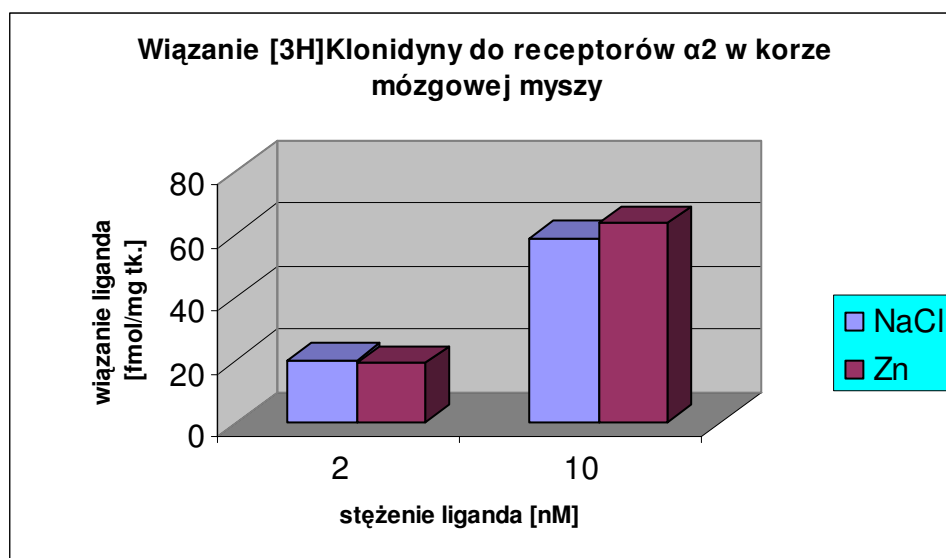
Ryc. 9. Zmiany wiązania [³H]Prazosyny do receptorów α_1 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodoroasparaginianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. Analiza testem t-studenta, * $p < 0,05$. Liczebność w grupach $N=5$.

| Stężenie liganda [nM] | NaCl [fmol/mg tk.] średnia+SEM | Zn [fmol/mg tk.] średnia+SEM | % kontroli |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------|
| 0,2 | 0,565± 0,07 | 0,824 ± 0,03 | 146* p<0,02 |
| 1 | 1,268 ± 0,15 | 1,685 ± 0,18 | 133* p<0,05 |

Tab. 2. Zmiany wiązania [3H]Prazosyny do receptorów α_1 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c.

Analiza dwupunktowa wiązania [³H]Klonidyny do receptora α_2 -adrenergicznego w korze mózgowej myszy

Badanie wpływu przewlekłego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c na powstawanie zmian adaptacyjnych receptorów α_2 nie wykazało znamiennej statystycznie różnicy (Rycina 10, Tabela 3).



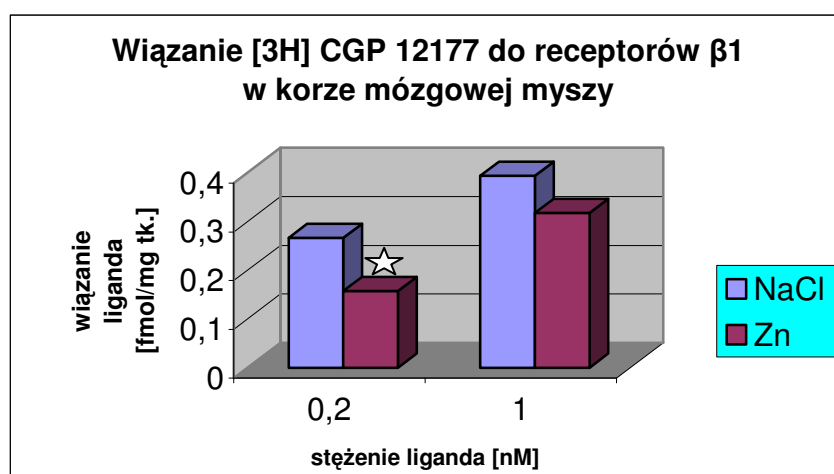
Ryc. 10. Zmiany wiązania [3H]Klonidyny do receptorów α_2 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. Analiza testem t-studenta. Liczebność w grupach N=5.

| Stężenie liganda [nM] | NaCl [fmol/mg tk.] średnia+SEM | Zn [fmol/mg tk.] średnia+SEM | % kontroli |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------|
| 2 | 20,04 ± 3,33 | 18,98 ± 4,64 | 95 p<0,8 |
| 10 | 59,00 ± 6,93 | 63,55 ± 9,94 | 108 p<0,7 |

Tab. 3. Wiązanie [³H] Klonidyny do receptorów α_2 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c.

Analiza dwupunktowa wiązania [³H]CGP 12177 do receptora β_1 -adrenergicznego w korze mózgowej myszy

Badając zmiany receptorów β_1 -adrenergicznych zachodzące pod wpływem przewlekłego podania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. zaobserwowano spadek wiązania liganda [³H] CGP 12177 do receptorów w przypadku obu zastosowanych stężeń liganda 0,2 i 1 nM o 40% i 19%. Znamienność statystyczną osiąga jedynie zmiana przy stężeniu liganda 0,2 nM. (Rycina 11, Tabela 4)



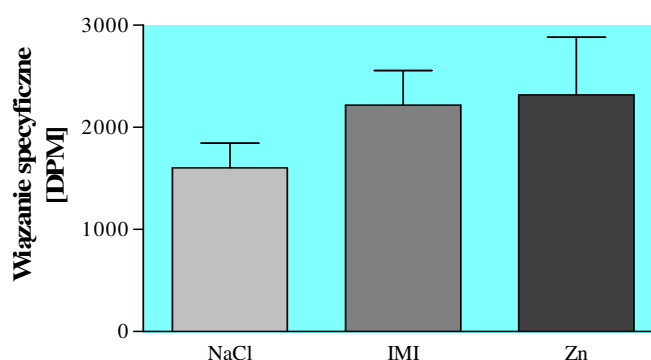
Ryc. 11. Zmiany wiązania [3H] CGP 12177 do receptorów β_1 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. Analiza testem t-studenta, *p<0,05. Liczebność w grupach N=5

| Stężenie liganda [nM] | NaCl [fmol/mg tk.] średnia+SEM | Zn [fmol/mg tk.] średnia+SEM | % kontroli |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------|
| 0,2 | 0,266 ± 0,03 | 0,157 ± 0,03 | 60* p<0,03 |
| 1 | 0,393 ± 0,04 | 0,317 ± 0,03 | 81 p<0,07 |

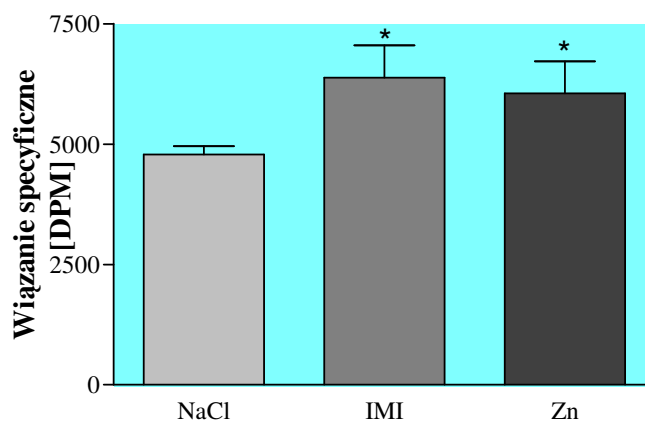
Tab. 4. Zmiany wiązania [³H]CGP 12177 do receptorów β₁ pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c.

Analiza dwupunktowa wiązania [³H]8OH-DPAT receptora serotonergicznego 5-HT_{1A} w hipokampie szczura

Uzyskane w przeprowadzonych badaniach wyniki wskazują na wzrost wiązania [³H]8-hydroxy-DPAT do receptorów 5-HT_{1A} w hipokampie szczura po wielokrotnym podawaniu imipraminy i wodorooasparagianu cynku w porównaniu do tkanki otrzymanej od szczurów, którym podawano roztwór fizjologiczny soli (0.9% NaCl), kolejno o 39% i 45% (dla stężenia liganda 1 nM), oraz kolejno o 33% i 27% (dla stężenia liganda 5 nM) (Rycina 12,13, Tabela 5). Wyniki są znamienne statystycznie tylko przy stężeniu liganda 5 nM.



Ryc. 12. Zmiany wiązania [³H]8OH-DPAT do receptorów serotonergicznycych 5-HT_{1A} w hipokampie szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c oraz imipraminy w dawce 15 mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną (stężenie liganda 1 nM). Zastosowano analizę wariancji (ANOVA) i test Dunnett'a. Brak znamienności. Liczebność w grupach N= 6-8.



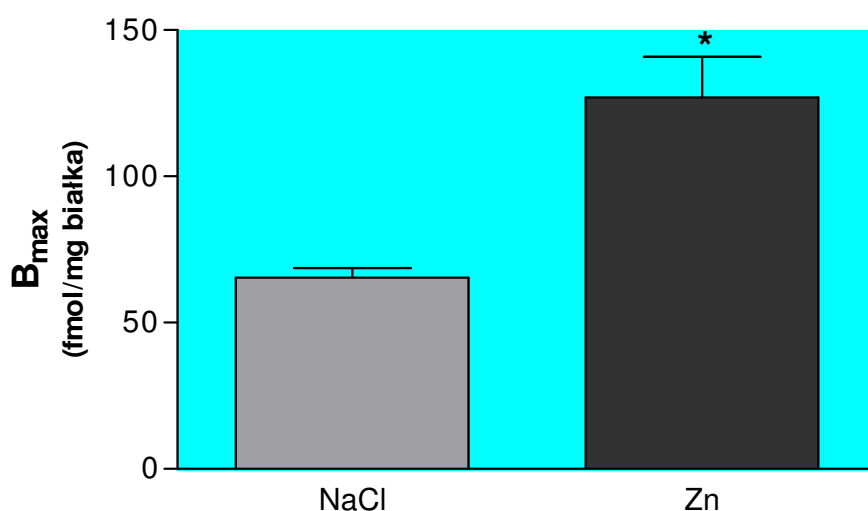
Ryc. 13. Zmiany wiązania [³H]8OH-DPAT do receptorów serotonergiczných 5-HT_{1A} w hipokampie szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagininianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. oraz imipraminy w dawce 15 mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną (stężenie liganda 5 nM). Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a, *p<0,05. Liczebność w grupach N= 6-8.

| Stężenie liganda znakowanego [³H] [nM] | NaCl Wiązanie specyficzne [fmol/mg tkanki] | IMI Wiązanie specyficzne [fmol/mg tkanki] | Zn Wiązanie specyficzne [fmol/mg tkanki] |
|--|---|--|---|
| 1 | 1,01±0,15 | 1,40±0,21 | 1,46±0,36 |
| 5 | 3,24±0,12 | 4,32±0,45* | 4,10±0,45* |

Tab. 5. Zmiany wiązania [³H]8OH-DPAT do receptorów serotonergiczných 5-HT_{1A} w hipokampie szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagininianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. oraz imipraminy w dawce 15 mg/kg m.c.

Analiza saturacyjna – wiązanie [³H]8-OH-DPAT do receptora 5-HT_{1A} w hipokampie szczura

Wyniki eksperymentów saturacyjnych receptorów 5-HT_{1A} po przewlekłym podawaniu wodorooasparagianu cynku oraz kontrolnie soli fizjologicznej, wskazują na statystycznie istotne zwiększenie wartości B_{max} po podaniach wodorooasparagianu cynku o około 94%. Wyniki przedstawiono w tabeli 6 i na rycinie 14.



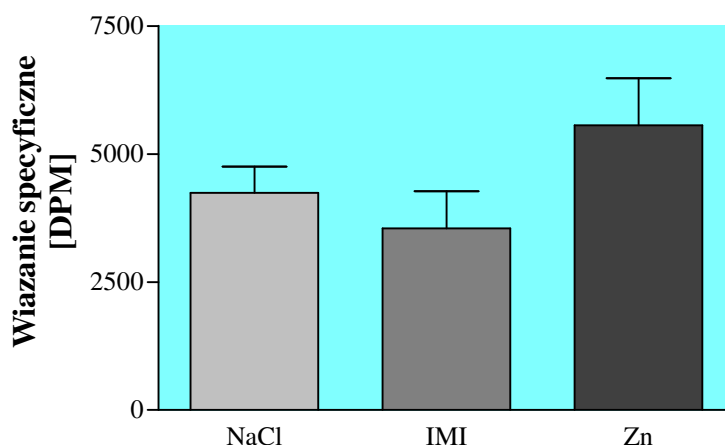
Ryc. 14. Zmiany wiązania [³H]8-OH DPAT do receptorów serotonergiczných 5-HT_{1A} w hipokampie szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną. Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a. NaCl vs Zn *p<0,05. Liczebność w grupach N=3.

| | K _D (nM) | B _{max} (fmol/mg białka) | % kontroli dla B _{max} |
|-----------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Kontrola | 5,8±1,6 | 65,4 | 100 |
| Cynk | 9,6±2,1 | 126,9 | 194* |

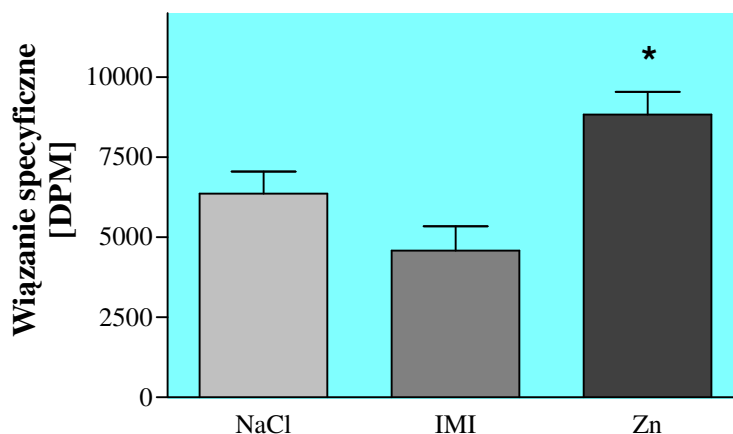
Tab. 6. Wpływ wielokrotnych podań wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. w porównaniu do kontroli na wiązanie [³H] 8-OH DPAT do receptorów 5-HT_{1A} w korze hipokampie szczura.

Analiza dwupunktowa wiązania [³H]Ketanseryny do receptora serotonergicznego 5-HT₂ w korze mózgowej szczura

Uzyskane wyniki wskazują na wzrost wiązania [³H]Ketanseryny do receptorów 5-HT₂ w korze mózgowej szczura po wielokrotnym podawaniu wodorooasparagianu cynku o 31% (przy stężeniu liganda 0.6 nM) i o 39% (przy stężeniu liganda 3 nM). W przypadku imipraminy natomiast, zaobserwowano spadek wiązania [³H]Ketanseryny do receptorów 5-HT₂ w korze mózgowej, w porównaniu do tkanki otrzymanej od szczurów, którym podawano roztwór fizjologiczny soli (0.9% NaCl), o 16% ([L]=0.6 nM) i o 28% ([L]=3 nM) (Rycina 15, 16, Tabela 7). Wyniki są znamienne statystycznie tylko przy stężeniu liganda 3 nM.



Ryc. 15. Zmiany wiązania [³H] Ketanseryny do receptorów serotonergiczných 5-HT₂ w korze mózgowej szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c oraz imipraminy w dawce 15 mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną (stężenie liganda 0,6 nM). Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a., Brak znamienności. Liczebność w grupach N= 6-8.



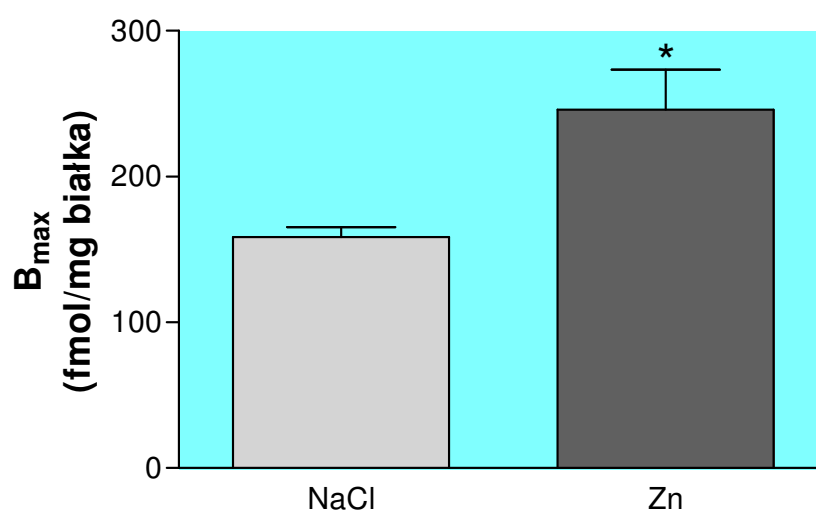
Ryc. 16. Zmiany wiązania [³H]Ketanseryny do receptorów serotoninergeicznych 5-HT₂ w korze mózgowej szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c oraz imipraminy w dawce 15 mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną (stężenie liganda 3 nM). Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a, *p<0,05. Liczebność w grupach N= 6-8.

| Stężenie liganda znakowanego [³ H] [nM] | NaCl Wiązanie specyficzne [fmol/mg tkanki] | IMI Wiązanie specyficzne [fmol/mg tkanki] | Zn Wiązanie specyficzne [fmol/mg tkanki] |
|---|---|--|---|
| 0,6 | 5,92±0,72 | 4,96±1,10 | 7,77±1,28 |
| 3 | 6,53±0,71 | 4,71±0,78 | 9,07±0,73* |

Tab. 7. Zmiany wiązania [³H]Ketanseryny do receptorów 5-HT₂ w korze mózgowej szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg i imipraminy w dawce 15 mg/kg. Wyniki przedstawiono jako średnie±SEM z 5 oznaczeń na grupę. *p<0,05 vs. grupa kontrolna (NaCl).

Analiza saturacyjna – wiązanie [³H]Ketanseryny do receptora 5-HT₂ w korze mózgowej szczura

Wyniki eksperymentów saturacyjnych receptorów 5-HT₂ po przewlekłym podawaniu wodorooasparagianu cynku oraz kontrolnie soli fizjologicznej, wskazują na statystycznie istotne zwiększenie wartości B_{max} po podaniach wodorooasparagianu cynku o około 55%. Wyniki przedstawiono w tabeli 8 i na rycinie 17.



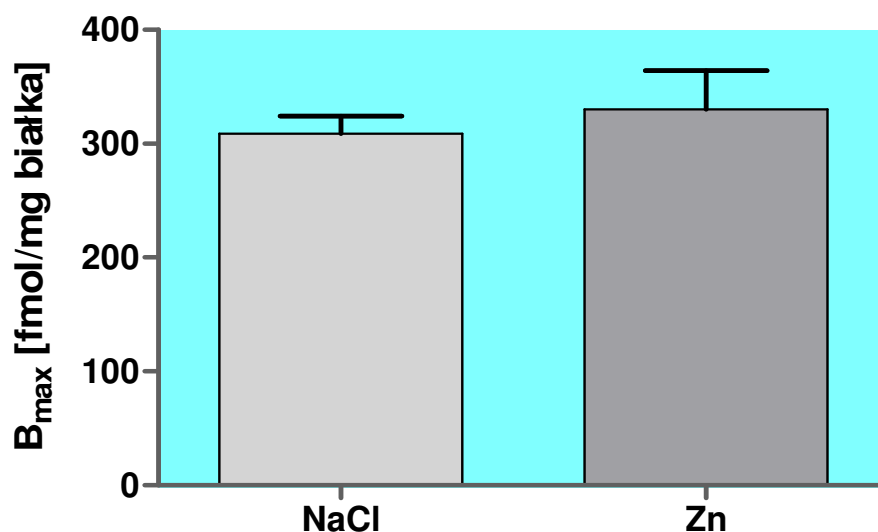
Ryc. 17. Zmiany wiązania [³H]Ketanseryny do receptorów serotonergiczných 5-HT₂ w korze mózgowej szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a. NaCl vs Zn *p<0,05. Liczebność w grupach N=5.

| | K _D (nM) | B _{max} (fmol/mg białka) | % kontroli dla B _{max} |
|-----------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Kontrola | 0,70±0,18 | 158,7±6,6 | 100 |
| Cynk | 0,61±0,10 | 245,8±27,6 | 156* |

Tab. 8. Wpływ wielokrotnych podań wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. w porównaniu do kontroli na wiązanie [³H]Ketanseryny do receptorów 5-HT₂ w korze mózgowej szczura.

Analiza saturacyjna – wiązanie [³H]MPEP do receptora mGluR5 w korze mózgowej szczura

Wykonane analizy wysyceniowe kory mózgowej szczura po wielokrotnym podawaniu wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. nie wykazały statystycznie istotnych zmian wartości B_{\max} w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki ilustrują rycina 18, tabela 9.



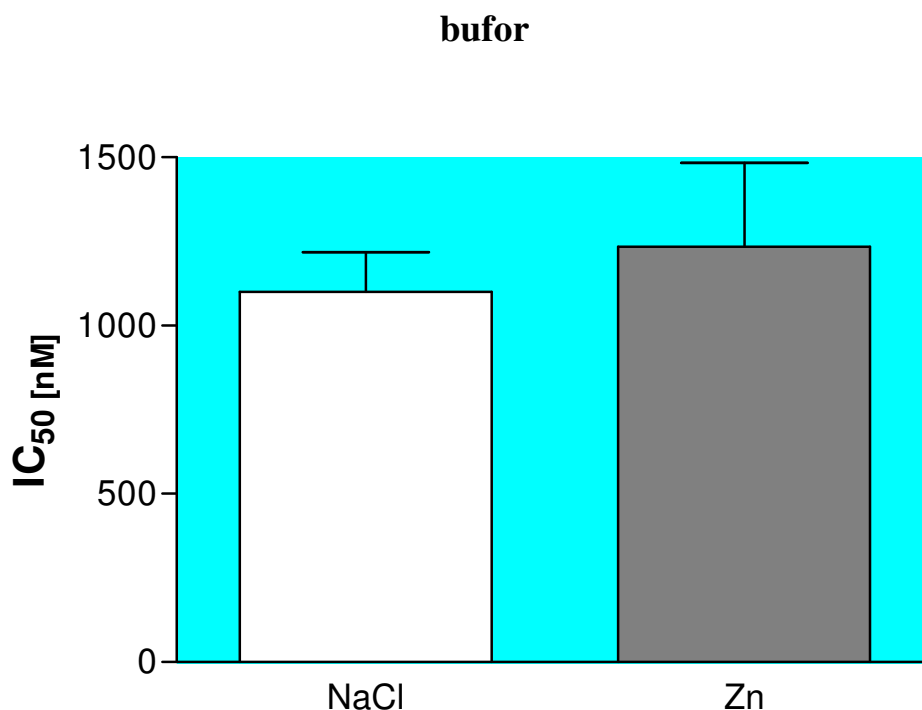
Ryc. 18 Wpływ wielokrotnych podań wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. na gęstość receptorów mGluR5 w korze mózgowej szczura. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. Do obliczeń zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test Dunnetta. Liczebność w grupach N= 5-7.

| | K_D (nM) | B_{\max} (fmol/mg białka) | % kontroli dla B_{\max} |
|-----------------|------------|--------------------------------|------------------------------|
| Kontrola | 8,63±0,69 | 308,7±15,56 | 100 |
| Cynk | 7,69±1,72 | 330,0±34,18 | 106 |

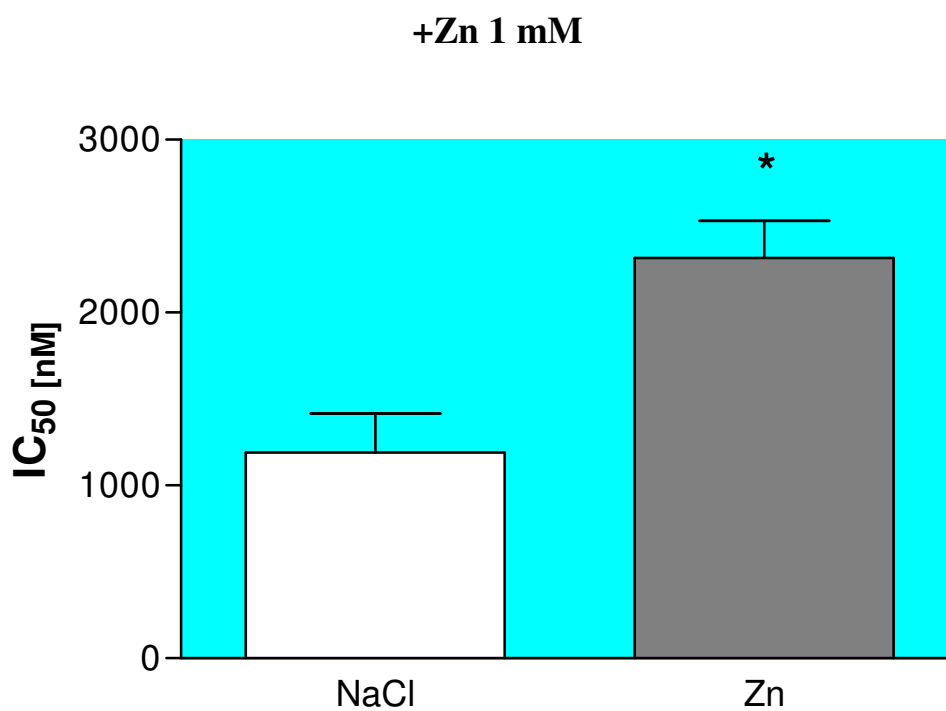
Tab. 9. Wpływ wielokrotnych podań wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. na wiązanie [³H]MPEP do receptorów mGluR5 w korze mózgowej szczura. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM

Analiza inhibycyjna – badanie powinowactwa glicyny do miejsca glicynowego kompleksu receptora NMDA w korze mózgowej szczura przy zastosowaniu liganda [³H]L-689 560

Badanie wpływu chronicznego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. na hamowanie przez glicynę wiązania [³H]L-689 560 do kompleksu receptora NMDA w korze mózgowej szczura, wykazało nieznaczny wzrost wartości IC₅₀ po terapii cynkiem w środowisku buforu (Rycina 19). Obecność w mieszaninie inkubacyjnej jonów cynku poprawiała detekcję otrzymanych zmian adaptacyjnych w obrębie kompleksu receptora NMDA. Chroniczne podania cynku spowodowały znamienne statystycznie wzrost wartości IC₅₀ o 88% (obniżenie powinowactwa glicyny) (Rycina 20).



Ryc. 19. Wynik dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. na wypieranie [³H]L-689,560 przez glicynę z wiązania do receptorów NMDA w korze mózgowej szczura w środowisku buforu. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Liczebność w grupach N=4-5.

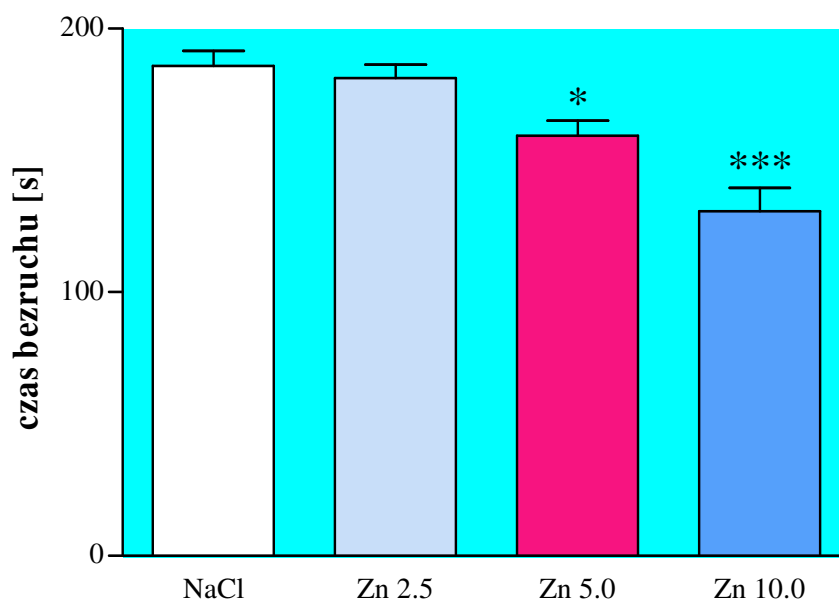


Ryc. 20. Wynik dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. na wypieranie [H^3]L-689,560 przez glicynę z wiązania do receptorów NMDA w korze mózgowej szczura. Analiza przeprowadzona w obecności 1 mM Zn. Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) * $p < 0,05$ vs NaCl. Liczebność w grupach N=4-5.

2 BADANIA BEHAWIORALNE

Wyznaczanie dawki aktywnej cynku w teście wymuszonego pływania wg Porsolta

Eksperyment przeprowadzono w celu ustalenia aktywnej dawki cynku (w postaci soli: wodorooasparaginian) w teście pływania u myszy. Wyniki działania cynku porównywano do soli fizjologicznej jako kontroli. Pierwsza z badanych dawek (2.5 mg/kg m.c.) nie zmieniła w sposób znamieny czasu bezruchu u badanych myszy. Podanie cynku w dawce 5 mg/kg m.c. skracało czas bezruchu o ~15 %, a w dawce 10 mg/kg m.c. o ~30%. Do dalszych badań użyto najmniejszej, aktywnej w teście pływania dawki (5 mg/kg m.c.). Otrzymane wyniki przedstawiono graficznie na rycinie 21 i zestawiono w tabeli 10.



Ryc. 21. Wyznaczanie dawki aktywnej cynku w teście Porsolta u myszy. Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs NaCl. Liczebność w grupach $N=9-11$.

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| NaCl | 185,9±16,2 | 100 |
| Zn 2,5 mg/kg m.c. | 181,3±15,2 | 97,5 |
| Zn 5 mg/kg m.c. | 159,4±16,9 | 85,7* |
| Zn 10 mg/kg m.c. | 130,7±26,8 | 70,3*** |

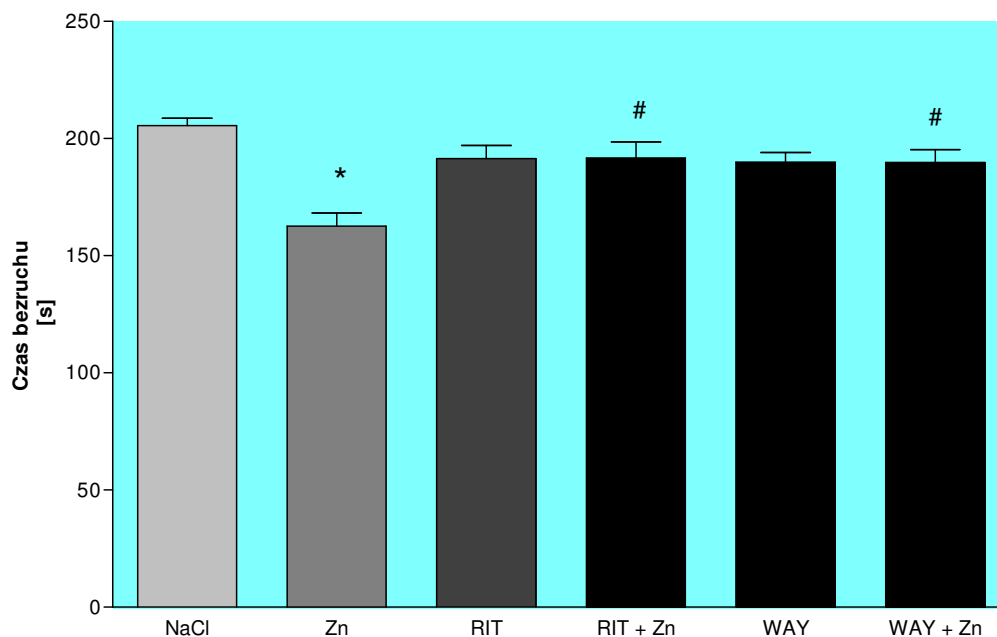
Tab. 10. Wpływ podania różnych dawek cynku na zachowanie myszy w teście Porsolta. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM.

Badanie udziału receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A/C} w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku - FST

Eksperyment przeprowadzono przy użyciu związków: WAY 100635 w dawce 0,3 mg/kg m.c., podawanego podskórnie, wykazującego działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów 5-HT_{1A} oraz ritanseryny w dawce 4 mg/kg m.c. o działaniu antagonistycznym w stosunku do receptorów 5-HT_{2A/C}. Następnie dootrzewnowo podawano cynk (5 mg/kg m.c.). Analiza otrzymanych wyników wskazuje na istotne skrócenie czasu bezruchu w porównaniu do grupy kontrolnej tylko w przypadku podania cynku o ~ 21 %. Podanie związku WAY 100635 oraz ritanseryny w grupach łączonych z cynkiem blokowało całkowicie aktywność cynku w wykonywanym teście (Rycina 22, Tab. 11).

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|-------------------|--------------------------|-------------------|
| NaCl | 205±3,09 | 100 |
| Zn 5 | 162,7±5,51* | 79,4 |
| WAY +Zn 5 | 189,8±5,52# | 92,6 |
| RIT + Zn 5 | 191,7±6,73# | 93,5 |
| WAY | 189,8±4,16 | 92,6 |
| RIT | 191,4±5,63 | 93,4 |

Tab. 11. Wpływ podania WAY 100635 (WAY) w dawce 0.3 mg/kg m.c. i ritanseryny (RIT) w dawce 4 mg/kg m.c. na aktywność cynku (Zn) w teście wymuszonego pływania u myszy. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM.

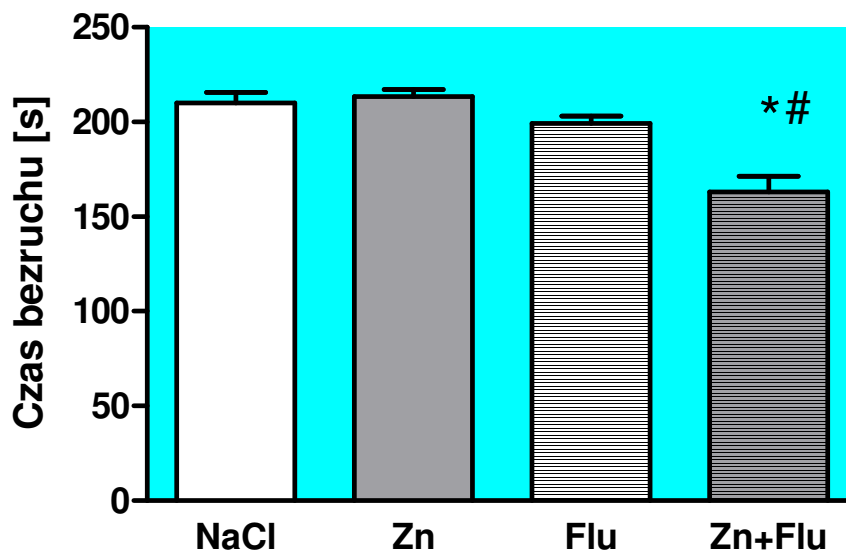


Ryc. 22. Wpływ podania WAY 100635 i ritanseryny na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) * $p < 0,01$ vs NaCl; # $p < 0,01$ vs Zn. Liczebność w grupach N=6-13.

Fluoksetyna jest LPD selektywnie blokującym wychwyt serotoniny. Do badań użyto fluoksetyny w nieaktywnej w teście pływania dawce 5 mg/kg m. c. oraz nieaktywnej dawki cynku (2.5 mg/kg m. c.). Zaobserwowano znamienne skrócenie czasu bezruchu o ~ 22% w przypadku łącznego podania w/w związków (Rycina 23 i Tabela 12).

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|---------------------|-------------------|------------|
| NaCl | 210,2±5,6 | 100 |
| Zn 2.5 | 213,5±3,8 | 102 |
| Flu + Zn 2.5 | 163,1±8,3 | 78* |
| Flu | 199,3±4,0 | 95 |

Tab. 12. Wpływ podania fluoksetyny w dawce 5 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM.



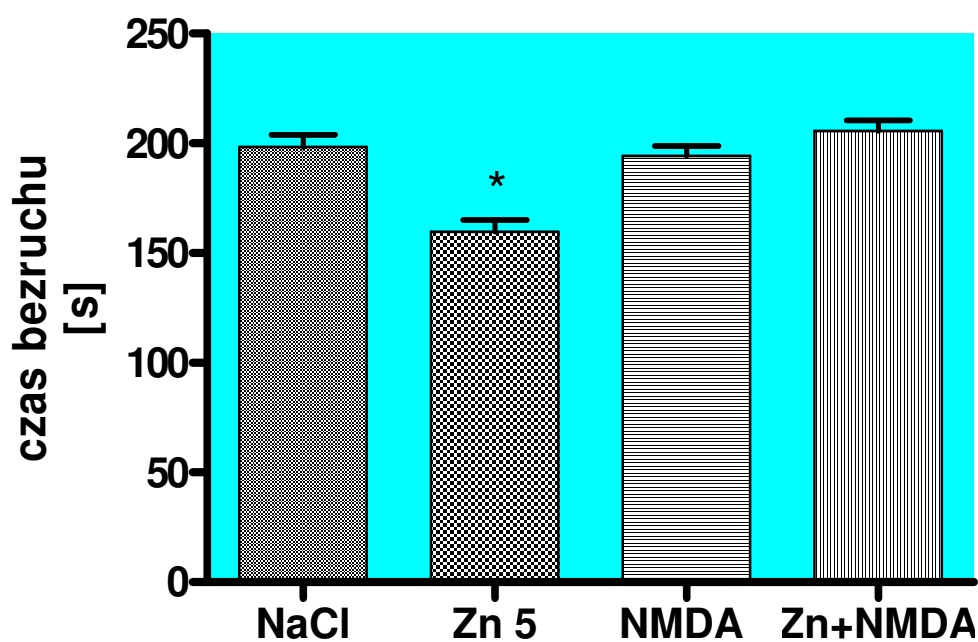
Ryc. 23. Wpływ łącznego podania fluoksetyny w dawce 5 mg/kg m.c. i cynku w dawce 2.5 mg/kg m. c. na czas bezruchu w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) * $p < 0,01$ vs NaCl, # $p < 0,001$ vs Zn (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N=9-10.

Badanie udziału receptorów NMDA w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku – test Porsolta

W eksperymencie zastosowano dawkę 75 mg NMDA /kg m.c., która nie wpływała na aktywność zwierząt w teście pływania. Stwierdzono znamienne skrócenie czasu bezruchu w przypadku podania cynku oraz zablokowanie tego działania w przypadku łącznego podania NMDA i cynku (Rycina 24 i Tabela 13).

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|-------------|-------------------|------------|
| NaCl | 198,5±12,7 | 100 |
| Zn 5 | 159,6±11,3 | 80,4* |
| NMDA + Zn 5 | 205,6±15,9 | 103,6 |
| NMDA | 193,0±14,9 | 97,2 |

Tab. 13. Wpływ podania NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM.

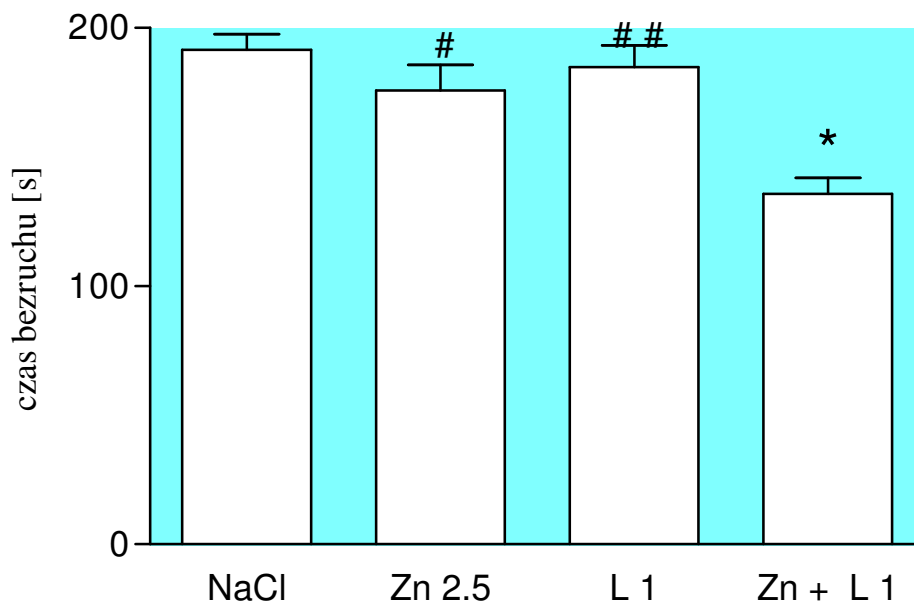


Ryc. 24. Wpływ podania NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Bonferroni. * $p < 0,05$ vs NaCl. Liczebność w grupach N=8-11.

Do badań użyto dawki 1 mg/kg m.c. związku L 701,324 (antagonista miejsca glicynowego receptora NMDA), która pozostawała bez wpływu na aktywność zwierząt w wykonywanym teście. Podanie łączne L 701,324 z nieaktywną dawką cynku (2.5 mg/kg m.c.) zniżyło czas bezruchu w teście pływania (Rycina 25 i Tabela 14)

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|--------------------|--------------------------|-------------------|
| NaCl | 191,6±17,9 | 100 |
| Zn 2.5 | 175,8±34,4 | 91,7 [#] |
| L1 | 184,9±28,6 | 96,5 [#] |
| L1 + Zn 2.5 | 135,8±19,3 | 70,9* |

Tab. 14. Wpływ podania L 701,324 w dawce 1 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM.

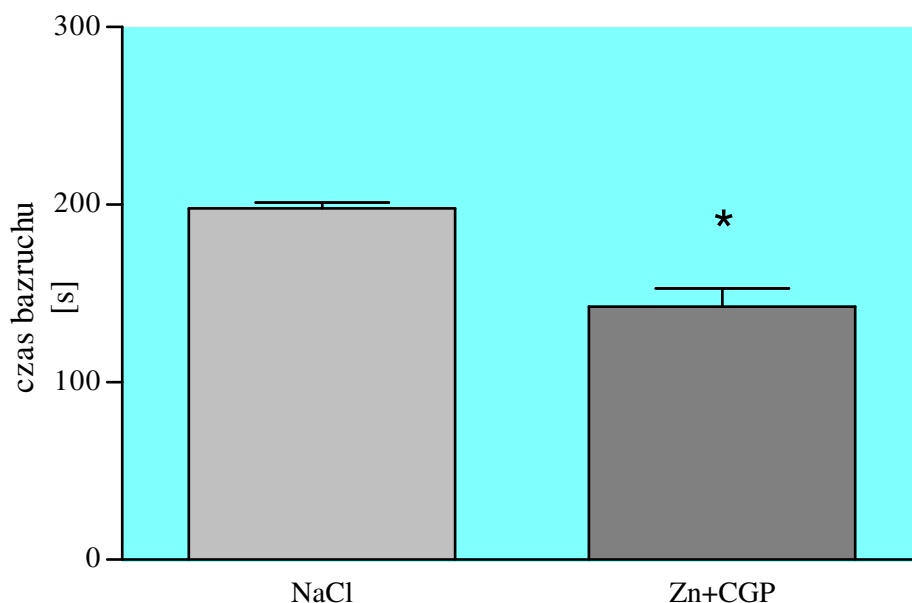


Ryc. 25. Wpływ podania L 701,324 w dawce 1 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnowej analizy wariacji (ANOVA) i testu Bonferroni. * $p < 0,05$ vs NaCl, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. Zn+L1. Liczebność w grupach N=9-12

W eksperymencie zastosowano dawkę 0.3 mg/kg m.c CGP 37849 (kompetycyjny antagonistą receptora NMDA), która nie wpływała na aktywność zwierząt w wykonywanym teście, podobnie jak użyta dawka 2.5 mg/kg m.c. cynku. Stwierdzono istotne statystycznie skrócenie czasu bezruchu w przypadku łącznego podania związków (Rycina 26 i Tabela 15).

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|--------------------|-------------------|------------|
| NaCl | 197,9±10,5 | 100 |
| CGP+ Zn 2.5 | 142,7±33,2 | 72,1* |

Tab. 15. Wpływ podania CGP37849 w dawce 0.3 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM.

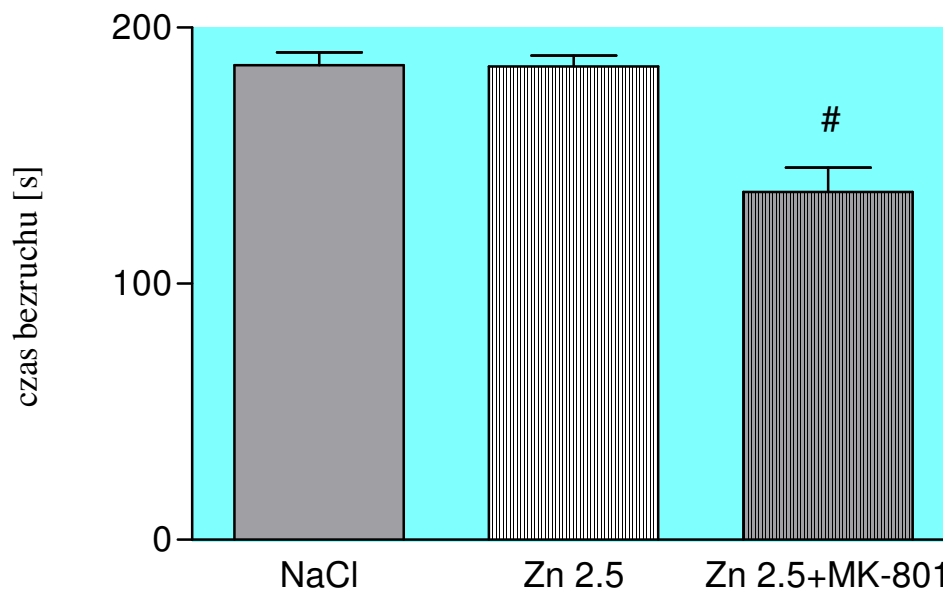


Ryc. 26. Wpływ podania CGP 37849 w dawce 0.3 mg/kg m.c. na aktywność cynku (2.5 mg/kg) w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem testu t-studenta. * $p < 0,05$ vs. NaCl. Liczebność w grupach N=11.

Do doświadczenia użyto dawki 0.05 mg/kg m.c. MK-801 (bloker kanału receptora NMDA), która nie wpływała na aktywność zwierząt w wykonywanym teście, podobnie jak zastosowana tu dawka cynku (2.5 mg/kg m.c.). Zaobserwowano znamienne skrócenie czasu bezruchu w przypadku łącznego podania w/w związków (Rycina 27 i Tabela 16).

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|-------------------|--------------------------|-------------------|
| NaCl | 185,2±16,2 | 100 |
| Zn 2.5 | 184,8±13,6 | 99,8 |
| MK+ Zn 2.5 | 135,7±28,8 | 73,3 [#] |

Tab. 16. Wpływ podania MK-801 w dawce 0.05 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM.



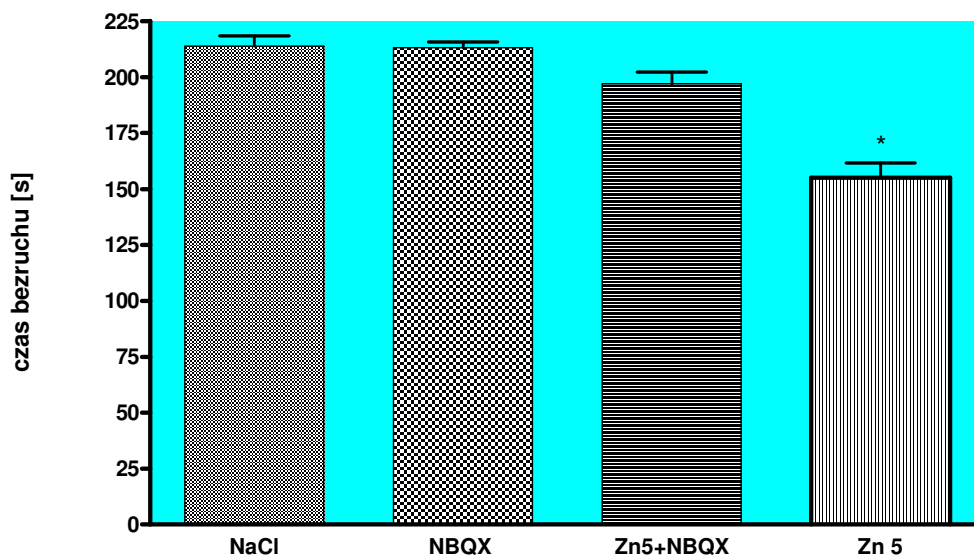
Ryc. 27. Wpływ podania MK-801 w dawce 0.05 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs. NaCl. Liczebność w grupach $N=9-10$.

Badanie udziału receptorów AMPA w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku – test Porsolta

NBQX jest antagonistą receptorów AMPA. Podany zwierzętom w dawce 10 mg/kg m.c. zablokował aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Skrócenie czasu bezruchu w porównaniu do grupy kontrolnej jest statystycznie istotne jedynie dla grupy: Cynk 5. (Tabela 17, Rycina 28).

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|--------------------|-------------------|------------|
| NaCl | 213,8±10,2 | 100 |
| Zn 5 | 155,1±18,5 | 72,5* |
| NBQX + Zn 5 | 197,0±14,7 | 92,1 |
| NBQX | 213,2±5,3 | 99,7 |

Tab. 17. Wpływ podania NBQX w dawce 10 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SEM.

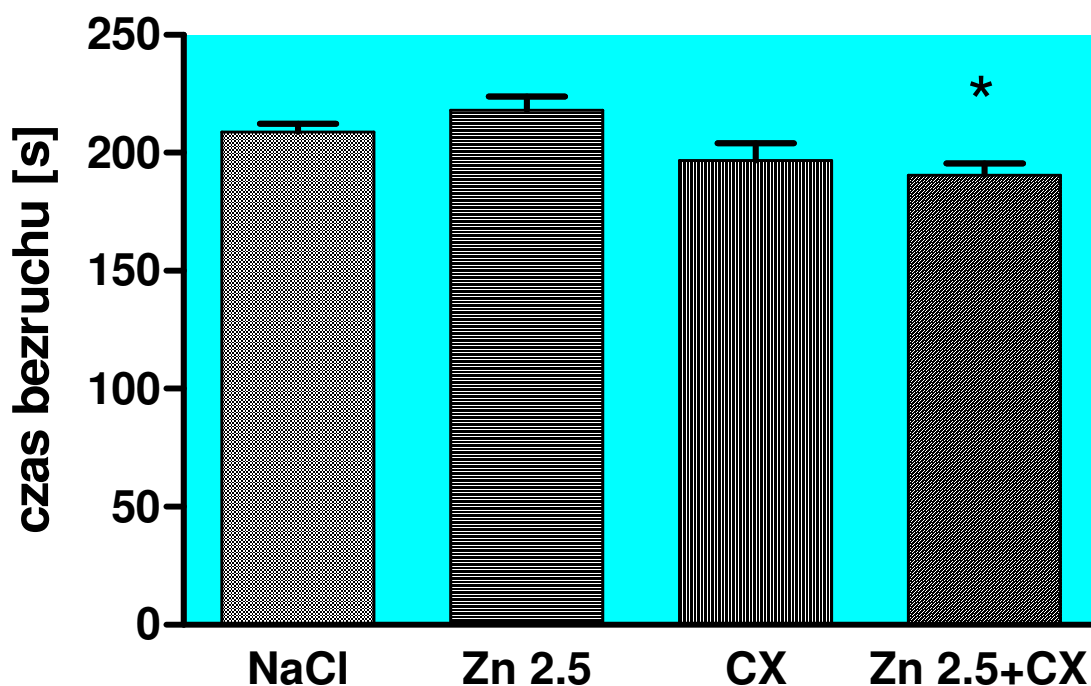


Ryc. 28. Wpływ podania NBQX w dawce 10 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji i testu Bonferroni. * $p < 0,01$ vs NaCl. Liczebność w grupach $N = 5-8$.

Związek CX 614 pozytywnym allosterycznym modulatorem receptora AMPA (tzw. AMPAkina). Podany zwierzętom w niskiej, nieaktywnej dawce 1 mg/kg m.c. łącznie z cynkiem w niskiej nieaktywnej dawce 2.5 mg/kg m.c. wywołuje słabą, ale statystycznie znaczącą redukcję czasu bezruchu u testowanych zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną. (Tabela 18, Rycina 29).

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|------------------------|-------------------|------------|
| NaCl | 212±6.5 | 100 |
| Zn 2.5 | 218±5.8 | 102.8 |
| CX 1.0 + Zn 2.5 | 190±4.9 | 89.6* |
| CX 1.0 | 196±7.3 | 92.4 |

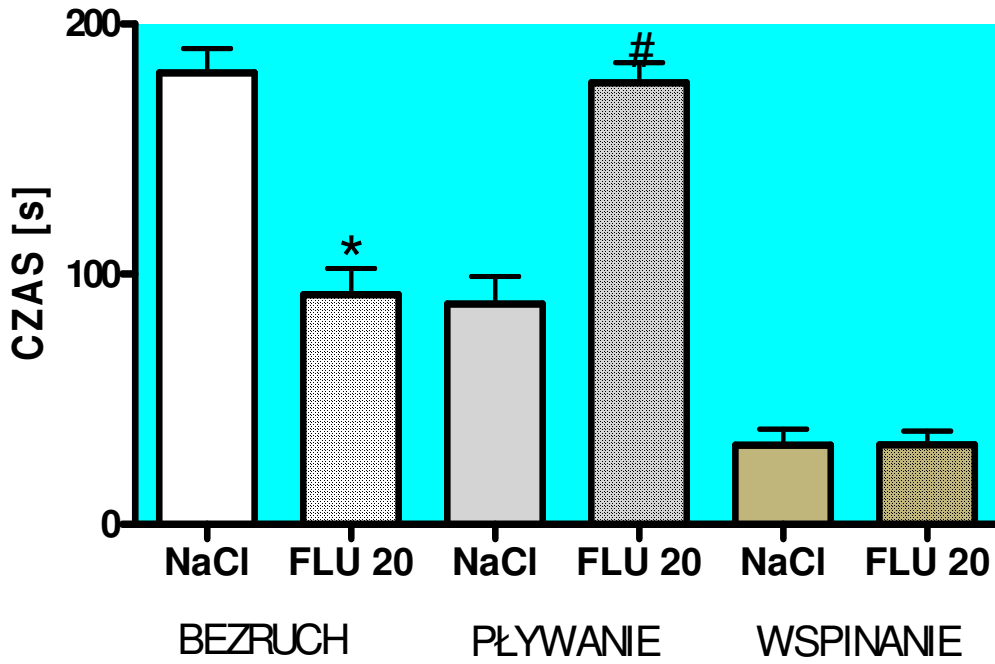
Tab. 18. Wpływ łącznych podań cynku w dawce 2.5 mg/kg m.c. i związku CX 614 w dawce 1 mg/kg m.c. na czas bezruchu zwierząt w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SEM.



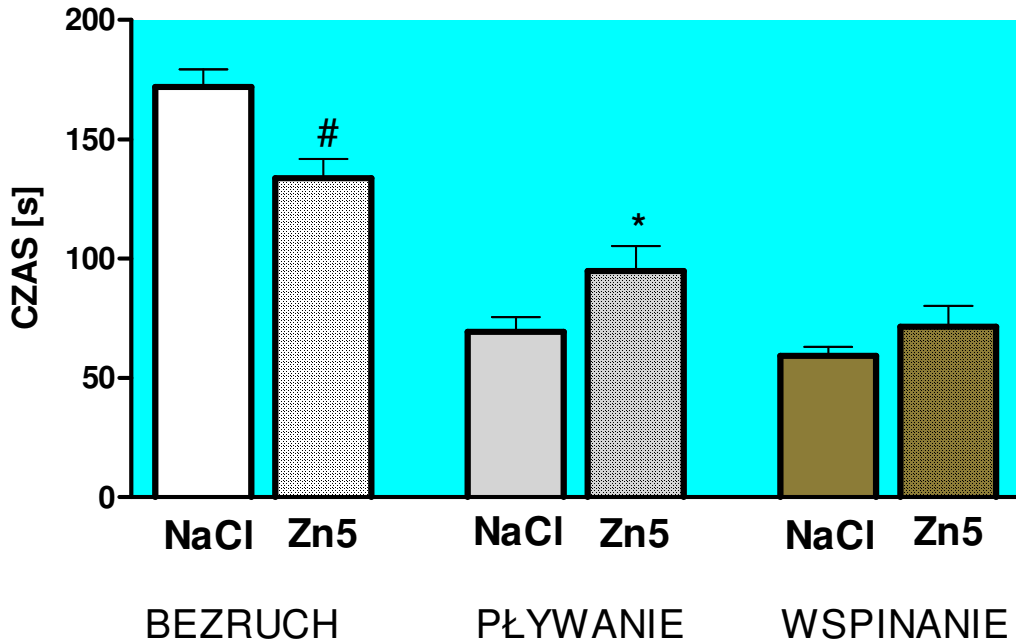
Ryc. 29. Wpływ łącznych podań cynku w dawce 2.5 mg/kg m.c. i związku CX 614 w dawce 1 mg/kg m.c. na czas bezruchu zwierząt w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji i testu Bonferroni. * $p < 0,05$ vs NaCl. Liczebność w grupach N= 8-12

Ocena komponenty serotonergicznej cynku w teście pływania u szczurów

Efekt podania fluoksetyny i cynku na czasy bezruchu, pływania i wspinania w FST ilustrują ryciny 30 i 31. Fluoksetyna w dawce 20 mg/kg m.c. zredukowała (o 49.1%) czas bezruchu, zwiększyła (o 100.6%) czas pływania i pozostała bez wpływu na czas wspinania. Cynk w dawce 5 mg/kg m.c. obniżył o 42.2% czas bezruchu, zwiększył o 80.4% czas pływania i również nie wpłynął w sposób istotny statystycznie na czas wspinania u szczurów w teście pływania.



Ryc. 30. Wływ podań fluoksetyny w dawce 20 mg/kg m.c. (FLU 20) na parametry: bezruch, pływanie, wspinanie w FST u szczurów. Wyniki podano jako wartości średnie \pm SEM. * $p < 0.05$, # $p < 0.001$ vs NaCl (test t-studenta). Liczebność w grupach $n=9-10$



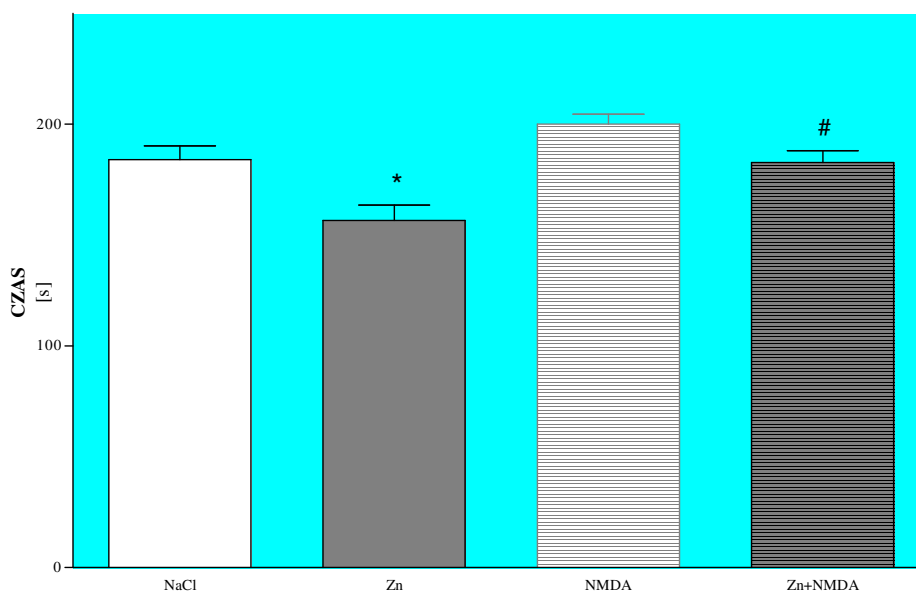
Ryc. 31. Wływ podań cynku w dawce 5 mg/kg m.c. (Zn 5) na parametry: bezruch, pływanie, wspinanie w FST u szczurów. Wyniki podano jako wartości średnie \pm SEM, liczebność w grupach $n=9-10$ * $p < 0.05$, # $p < 0.05$ vs NaCl (test t-studenta).

Ocena komponenty glutaminianergicznej cynku w teście pływania u szczurów

W badaniach zastosowano dawkę 75 mg/kg m. c. NMDA, która nie zmieniała aktywności zwierząt w teście pływania oraz aktywną dawkę cynku (5 mg/kg m. c.). Stwierdzono znamienne skrócenie czasu bezruchu w przypadku podania cynku oraz zablokowanie tego efektu w przypadku łącznego podania NMDA i cynku (Rycina 32, Tabela 19).

| | Czas bezruchu [s] | % kontroli |
|--------------------|-------------------|-----------------|
| NaCl | 184,1±6,2 | 100 |
| Zn 5 | 156,6±6,9 | 85* |
| NMDA + Zn 5 | 182,8±5,4 | 99 [#] |
| NMDA | 200,1±4,5 | 109 |

Tab. 19. Wpływ podania NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania u szczurów. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM.



Ryc. 32. Wpływ podania NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Newman-Keulsa. * $p < 0,05$ vs NaCl, # $p < 0,05$ vs Zn. Liczebność w grupach $N=8$.

Wpływ podania cynku i WAY100635 na aktywność lokomotoryczną myszy

WAY100635 w dawce 0,3 mg/kg m.c. i cynk w dawce 5 mg/kg m.c. podane razem lub osobno nie nasilają aktywności lokomotorycznej myszy (Tabela 20).

| | po 2 min | po 4 min | po 6 min | po 10 min | po 30 min |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM |
| NaCl | 72,7±8,6 | 128,7±9,6 | 175,0±14,6 | 258,0±30,4 | 481,4±7,8 |
| WAY 0.3 | 59,8±4,9 | 108,0±10,1 | 154,8±12,5 | 220,3±19,6 | 380,5±40,5 |
| Zn 5 | 28,0±10,0* | 51,0±24,2* | 62,0±33,2* | 118,0±60,6* | 165,0±38,0* |
| Zn+WAY | 30,3±5,6* | 55,3±11,0* | 66,8±13,5* | 101,8±26,0* | 174,5±52,6* |

Tab. 20. Wpływ podania cynku w dawce 5 mg/kg m.c. i WAY100635 w dawce 0,3 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). * $p < 0.05$ vs NaCl (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N= 6.

Wpływ podania cynku i ritanseryny na aktywność lokomotoryczną myszy

Cynk w dawce 5 mg/kg m.c. podany łącznie z ritanseryną w dawce 4 mg/kg m.c. nie nasilał w sposób istotny statystycznie aktywności lokomotorycznej myszy. Zaobserwowano natomiast hamowanie ruchliwości zwierząt podczas dwóch pierwszych minut testu w wyniku podania samej ritanseryny. Spadek aktywności lokomotorycznej w tym przypadku był znamieny statystycznie (* $p < 0,05$ vs NaCl). Po upływie dwóch minut nie obserwowano istotnej różnicy pomiędzy grupami (Tabela 21).

| | po 2 min | po 4 min | po 6 min | po 10 min | po 30 min |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM |
| NaCl | 61,3±8,5 | 99,8±13,4 | 131,3±18,5 | 181,5±26,3 | 395,8±44,9 |
| Rit 4 | 41,3±1,9* | 86,7±7,8 | 104,6±6,5 | 143,2±13,4 | 249,2±25,6 |
| Zn 5 | 28,6±5,1* | 46,6±8,3* | 65,0±11,0* | 120,0±13,3* | 150,0±24,0* |
| Zn+Rit | 44,2±5,4* | 87,2±14,1 | 115,5±22,6 | 159,8±40,2 | 223,7±53,7* |

Tab. 21. Wpływ podania cynku w dawce 5 mg/kg m.c. i Ritanseryny (Rit) w dawce 4 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę przeprowadzono przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). *p < 0.05 vs NaCl (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N= 6.

Wpływ podania cynku i NMDA na aktywność lokomotoryczną myszy

Nie zaobserwowano nasilenia aktywności lokomotorycznej u myszy ani po łącznym podaniu cynku (5 mg/kg m.c.) i NMDA (75 mg/kg m.c.), ani też po podaniu każdego z tych związków osobno. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 22.

| | po 2 min | po 4 min | po 6 min | po 10 min | po 30 min |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM |
| NaCl | 76,7±7,5 | 113,8±10,1 | 147,0±13,9 | 207,0±17,9 | 440,0±49,7 |
| Zn 5 | 27,8±4,4* | 51,0±9,6* | 62,0±13,7* | 82,0±20,8* | 120,5±27,8* |
| Zn+NMDA | 41,5±6,8* | 59,3±8,4* | 76,2±9,3* | 89,7±10,0* | 194,2±34,6* |
| NMDA | 54,8±5,9 | 101,0±10,8 | 141,7±15,7 | 198,8±20,0 | 314,8±43,6 |

Tab. 22. Wpływ podania cynku w dawce 5 mg/kg m.c. i NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). *p < 0.05 vs NaCl (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N= 6.

Wpływ podania cynku i ligandów receptorów glutamatergicznych na aktywność lokomotoryczną myszy

Nie zaobserwowano zwiększenia aktywności lokomotorycznej w grupach łączonych po podaniach cynku w dawce 2.5 mg/kg m. c. kolejno ze związkami: L-701,324 (w dawce 1 mg/kg m. c.), MK-801 (w dawce 0.05 mg/kg m. c.), CX 614 (1 mg/kg m.c.) i CGP 37849 (w dawce 0,3 mg/kg m. c.) u myszy w porównaniu z grupą kontrolną. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 23.

| | po 2 min średnia ± SEM | po 4 min średnia ± SEM | po 6 min średnia ± SEM | po 10 min średnia ± SEM |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| NaCl | 64,2±3,5 | 130,1±7,1 | 186,9±10 | 298,0±10,3 |
| L+Zn | 71,5±10,3 | 134,2±7,1 | 188,5±19,8 | 293,3±32,1 |
| MK+Zn | 68,6±3,4 | 124,6±9,3 | 179,2±15,6 | 265,6±20,4 |
| CX+Zn | 67,0±5,1 | 127,0±11,1 | 176,7±19,7 | 265,1±33,6 |
| NaCl | 45,3±5,1 | 81,3±7,5 | 113,7±10,8 | 176,8±24,3 |
| CGP+Zn | 58,0±3,0 | 94,1±3,2 | 123,0±7,4 | 162,5±19,1 |

Tab. 23. Wpływ łącznych podań cynku w dawce 2.5 mg/kg m.c. i związków L- 701,324, MK- 801, CX 614 oraz CGP 37849 kolejno w dawkach 1, 0.05, 1 i 0.3 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Bonferroni. Liczebność w grupach N= 8-12.

Wpływ podania cynku i NBQX na aktywność lokomotoryczną myszy

Zarówno cynk (5 mg/kg m.c.) i NBQX (10 mg/kg m.c.) podane razem, jak i osobno nie zwiększały aktywności lokomotorycznej u myszy w porównaniu z grupą kontrolną. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 24.

| | po 2 min | po 4 min | po 6 min | po 10 min | po 30 min |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM | średnia ± SEM |
| NaCl | 58,0±3,2 | 96,2±7,1 | 128,4±12,5 | 173,4±16,4 | 270,2±25,8 |
| Zn 5 | 28,7±10,2* | 46,7±15,6* | 58,2±21,0 | 69,2±29,4* | 104,7±33,7 |
| Zn+NBQX | 23,8±8,1* | 43,0±15,6* | 52,8±19,5* | 71,8±30,2 | 150,0±79,5 |
| NBQX | 51,5±4,5 | 96,8±10,0 | 133,0±13,8 | 167,3±20,2 | 287,2±45,1 |

Tab. 24. Wpływ podania cynku w dawce 5 mg/kg m.c. i NBQX w dawce 10 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). *p < 0.05 vs NaCl (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N= 6.

DYSKUSJA

KOMPLEKS RECEPTORA NMDA W PRZECIWDEPRESYJNYM MECHANIZMIE DZIAŁANIA JONÓW CYNKU

Układ glutaminianergiczny, a szczególnie modulacja aktywności receptora NMDA oraz zaburzenia zależnych od tego układu mechanizmów plastyczności neuronalnej są zaangażowane w etiopatogenezę zaburzeń depresyjnych i mechanizm działania LPD [Duman 2004a]. Świadczą o tym między innymi obserwowane w przebiegu depresji obwodowe i ośrodkowe oznaki zaburzenia funkcji układu aminokwasów pobudzających, czynnościowa i strukturalna patologia tego układu widoczna w zwierzęcych testach i modelach depresji oraz w badaniach klinicznych [Zarate i wsp. 2003], jak również przeciwdepresyjne działanie związków hamujących aktywność receptora NMDA [Skolnick 2002]. Wyniki badań analizujących wpływ LPD na powinowactwo agonistów miejsc pobudzających i modulujących receptora oraz ekspresję genów kodujących poszczególne podjednostki, wskazują na redukcję aktywności receptora NMDA w odpowiedzi na chronicznie stosowane LPD lub elektrowstrząsy [Pałucha i wsp. 2005].

Wpływ chronicznych podań cynku na powstawanie zmian adaptacyjnych kompleksu receptora NMDA

Efekt kliniczny działania LPD uwidacznia się dopiero po 2-3 tygodniach stosowania tych leków [Oswald i wsp. 1973], a za jego źródło uznaje się długoterminowe, stopniowo powstające wtórne zmiany adaptacyjne pojawiające się w odpowiedzi na nasiloną transmisję monoaminergiczną.

Udowodniono, że wielokrotne podania LPD, należących do różnych grup (TLPD, IMAO, SSRI), a także ECS powodują powstanie zmian adaptacyjnych także w kompleksie receptora NMDA w mózgu gryzoni [Nowak i wsp. 1993, Nowak 1997, Skolnick i wsp. 1996, 1996, Popik i wsp. 2000]. Zmiany te przejawiają się redukcją powinowactwa glicyny

do jej miejsca wiążącego w obrębie kompleksu receptora NMDA (podobny efekt występuje po wielokrotnych podaniach antagonistów receptora NMDA: ACPC i eliprodilu), [Nowak i wsp. 1993, Layer i wsp. 1995] oraz zmniejszeniem zdolności glicyny do modulowania miejsc glutamatergicznych w kompleksie receptora NMDA [Paul i wsp. 1993, Nowak i wsp. 1993, 1996, 1998a].

Kolejne badania dowiodły, że w wyniku wielokrotnych podań imipraminy dochodzi do spowolnienia procesu wiązania selektywnego liganda [³H]MK-801 do miejsca fencyklidynowego receptora NMDA w korze mózgowej myszy [Nowak i wsp. 1993], co może mieć związek z obniżeniem szybkości otwierania się kanału wapniowego związanego z receptorem NMDA.

Ponieważ skład podjednostek receptora NMDA jest istotny dla powinowactwa ligandów do miejsc modulujących tego receptora, wyżej opisane efekty receptorowe wiąże się ze zmianami w syntezie mRNA i białek podjednostek budujących receptor NMDA. Rezultatem wielokrotnie stosowanych LPD, jest zmiana wzajemnych proporcji podjednostek budujących kompleks receptora, prowadząca do osłabienia jego funkcji [Paul i wsp. 2003].

Cynk jest antagonistą receptora NMDA [Peters i wsp. 1987, Westbrook i wsp. 1987]. Chroniczne podania imipraminy powodują wzrost powinowactwa cynku do cynkowego miejsca modulacyjnego receptora NMDA, czego efektem jest hamowanie aktywności receptora NMDA [Szewczyk i wsp. 2001]. Hamowanie aktywności receptora NMDA jest też efektem ECS, które indukują wzrost stężenia synaptycznego cynku w hipokampie [Vaidya i wsp. 1999]. Wykazano również zmiany w powinowactwie cynku do receptora NMDA, w hipokampach ofiar samobójstw [Nowak i wsp. 2003b]. W kontrolowanym badaniu klinicznym suplementacja standardowego leczenia przeciwdepresyjnego preparatami cynku przyniosła istotną poprawę stanu zdrowia chorych [Nowak i wsp. 2003a, Siwek i wsp. 2009].

We wcześniejszych eksperymentach zmniejszenie powinowactwa glicyny do jej miejsc wiążących w kompleksie receptora NMDA mierzono hamowaniem wiązania znakowanego liganda: [³H]kwasu 5,7-dichlorokinurenowego (5,7-DCKA) przez glicynę [Nowak i wsp. 1993, Paul i wsp. 1993]. Imipramina, w dawce 15 mg/kg masy ciała podawana szczurom chronicznie przez dwa tygodnie powoduje statystycznie istotne zmniejszenie hamowania przez glicynę wiązania [³H]5,7-DCKA do miejsca glicynowego. Procedura wiązania do receptora oraz sposób przygotowania tkanki do oznaczeń, przy użyciu wyżej wymienionego liganda są niestety nie tylko bardzo czaso- ale i praco- chłonne ze względu

na etap wirowania niezbędny w procesie rozdzału. Dlatego zdecydowałam o zastosowaniu innego liganda znakującego miejsca glicynowe w kompleksie receptora NMDA:[3H]L-689,560[(±-4-(trans)-karboksy-5,7-dichloro-4phenylaminokarbonyloamino-1,2,3,4-tetrahydrokwinolina]. Procedura oznaczenia w tym wypadku nie wymaga wirowania, lecz szybkiej filtracji w procesie rozdzału. W przeprowadzonych przez nas wcześniejszych badaniach, w których ocenialiśmy wrażliwość tej metody analizy radioreceptorowej na powstałe zmiany adaptacyjne po przewlekłych dwutygodniowych podaniach imipraminy w dawce 15 mg/kg masy ciała, nie zaobserwowaliśmy statystycznie istotnych różnic w zdolności glicyny do hamowania wiązania [3H]L-689,560 w korze mózgowej myszy lub szczura. Natomiast imipramina podawana przez okres czterech tygodni myszom, w tej samej dawce spowodowała znaczący wzrost (71%) wartości IC_{50} dla glicyny. Dodanie jonów cynku do mieszaniny inkubacyjnej znacznie poprawiło detekcję powstałych zmian, które były widoczne już po dwóch tygodniach stosowania imipraminy [Dybała i wsp. 2006]. Wysycenie miejsc wiążących cynk w kompleksie receptora NMDA jonami cynku, ujawnia wyzwalaną przez imipraminę redukcję powinowactwa glicyny do jej miejsca wiążącego w obrębie receptora NMDA, przy zastosowaniu metodyki badawczej, wykorzystującej do oznaczeń ligand [3H]L-689,560. Zjawisko to sugeruje potencjalną możliwość wyjaśnienia mechanizmu, związanego z nasilaniem efektywności terapii przeciwdepresyjnej suplementacją jonami cynku, potwierdzonej zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i klinicznych [Nowak i wsp. 2003a, Szewczyk i wsp. 2008, Siwek i wsp. 2009]

Dla celów niniejszej pracy wykonałam analizy radioreceptorowe z użyciem liganda [3H]L-689,560, w których badałam wpływ chronicznego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. na hamowanie przez glicynę wiązania [3H]L-689,560 do kompleksu receptora NMDA w korze mózgowej szczura. Wyniki, które otrzymałam, wykazały wzrost wartości IC_{50} dla glicyny po dwutygodniowej terapii cynkiem. Nie były one jednak statystycznie istotne przy zastosowaniu standardowej procedury. Podobnie jak w przypadku imipraminy, dopiero obecność jonów cynku o stężeniu 1000 μ M w mieszaninie inkubacyjnej, ujawniła zmiany adaptacyjne w obrębie kompleksu receptora NMDA, po chronicznych podaniach cynku. Zanotowałam istotny statystycznie wzrost wartości IC_{50} glicyny, wskazujący na zmniejszenie powinowactwa glicyny do jej miejsca wiążącego w obrębie kompleksu receptora NMDA, a zatem na hamowanie funkcji receptora NMDA. Obserwowane zmiany są analogiczne do wywoływanych przez imipraminę.

Miejsce glicynowe (Gly_B) zlokalizowane jest preferencyjnie na podjednostce NR1 kompleksu receptora NMDA [Mayer i wsp.2004], a miejsca o wysokim powinowactwie dla L-689,560 występują na receptorze NMDA zbudowanym z podjednostek NR1/NR2A [Avent i wsp. 1997]. Cynk z kolei hamuje receptor NMDA o składzie podjednostkowym NR1/NR2A z wysokim powinowactwem, podczas gdy receptor zawierający podjednostki NR1/NR2B jest hamowany przez ten jon bardzo słabo [Paoletti i wsp. 1997, Izumi i wsp. 2006]. Wysycenie miejsc wiążących cynk o niskim (i prawdopodobnie wysokim) powinowactwie przez 1mM Zn²⁺ zredukowało powinowactwo glicyny w korze mózgowej po chronicznych podaniach imipraminy i cynku. W ten sposób, wyniki eksperymentu mogą sugerować zmiany w interakcji pomiędzy podjednostkami NR1/NR2A, a NR1/NR2B kompleksu receptora NMDA indukowane chroniczną terapią przeciwdepresyjną, aczkolwiek obserwacje te wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach.

Pojawienie się zmian adaptacyjnych w kompleksie receptora NMDA jest niezbędnym elementem odpowiedzi neuronalnej na stosowanie LPD [Skolnick i wsp. 1996]. Wyniki naszych badań pokazują, że chronicznie stosowany cynk wywołuje zmiany adaptacyjne receptora NMDA podobne do zmian powstałych po klasycznym LPD- imipraminie. Teoria Skolnicka łączy adaptacje receptora NMDA z wywołanym przez LPD pobudzającym wpływem na syntezę BDNF. Sam BDNF hamuje funkcję receptora NMDA poprzez zmniejszanie ekspresji białek podjednostek tego receptora [Skolnick 1999]. Chroniczne podania cynku zwiększają poziom mRNA białka dla BDNF w hipokampie i/lub korze mózgowej [Nowak i wsp. 2004; Sowa- Kućma i wsp. 2008]. W świetle przedstawionych danych mechanizm przeciwdepresyjnego działania cynku wydaje się być ściśle powiązany z receptorem NMDA.

Udział kompleksu receptora NMDA w mechanizmie przeciwdepresyjnej aktywności jonów cynku - test pływania.

Test wymuszonego pływania (FST) [Porsolt i wsp. 1977] jest jednym z behawioralnych testów skryningowych, w których wykorzystuje się manipulacje warunkami środowiska, co prowadzi do zmian w zachowaniu się testowanych zwierząt. Zmiany te z kolei są modulowane przez LPD. Większość LPD wykazuje aktywność w tym teście [Borsini

i wsp. 1988, Krocza i wsp. 2001]. Ze względu na stosunkowo proste wykonanie oraz skuteczność wykrywania aktywności przeciwdepresyjnej, najczęściej zarówno po podaniach jedno- jak i wielokrotnych, jest chętnie i często wykorzystywany przez badaczy [Cryan i wsp. 2002, 2005, Petit- Demouliere i wsp. 2005, Borsini i wsp. 1988].

Aktywność przeciwdepresyjna cynku w testach behawioralnych (FST, TST) [Krocza i wsp. 2001, Nowak i wsp. 2003c, Rosa i wsp. 2003] oraz potencjalizacja aktywności przeciwdepresyjnej klasycznych LPD (imipramina, citalopram) w FST [Krocza i wsp. 2001, Szewczyk i wsp. 2002, Rosa i wsp. 2003], jak również aktywność cynku w modelach depresji: bulbektomii (ang. *olfactory bulbectomy*- OB), [Nowak i wsp. 2003c], chronicznym nieprzewidywalnym stresie (ang. *chronic unpredictable stress*- CUS) [Cieślik i wsp. 2007], czy chronicznym łagodnym stresie (ang. *chronic mild stress*- CMS) [Sowa- Kućma i wsp. 2008], jak również wyniki własnych badań radioreceptorowych, skłoniły mnie do postawienia pytania o udział receptorów NMDA w mechanizmie działania przeciwdepresyjnego tego biometalu. W pierwszym etapie postanowiłam zbadać rolę receptora NMDA w teście wymuszonego pływania, według procedury Porsolta [Porsolt i wsp. 1977], w którym użyłam agonisty receptora NMDA: kwasu N-metylo-D-asparaginowego, w celu aktywacji tego receptora. Cynk podany zwierzętom, które uprzednio otrzymały NMDA, nie skrócił czasu bezruchu badanych zwierząt. NMDA zablokował aktywność przeciwdepresyjną cynku, nie zwiększając przy tym aktywności lokomotorycznej testowanych zwierząt. Wskazuje to na udział kompleksu receptora NMDA w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania cynku.

Kolejnym etapem badań było zastosowanie w teście wymuszonego pływania u myszy antagonistów receptora NMDA. Dzięki nim mogłam udzielić odpowiedzi na nurtujące mnie pytanie: czy wystąpi potencjalizacja działania cynku, w jego niskiej, nieaktywnej dawce podanego łącznie z niskimi, nieaktywnymi dawkami antagonistów receptora NMDA. Unikalność receptora NMDA wiąże się z obligatoryjną obecnością koagonisty (glicyna lub D-seryna), który wiąże się w miejscu odległym od miejsca wiążącego dla glutaminianu, zwiększając powinowactwo receptora do jego endogennego agonisty glutaminianu. W obrębie kompleksu tego receptora występują także miejsca wiążące dla substancji, które mogą modulować jego aktywność (poliaminy, fencyklidyna, jony magnezu czy cynku). Antagonistów receptora NMDA można zatem podzielić na kilka grup. Antagoniści kompetyjni, do których należy użyty przez nas CGP 37849, działają w miejscu wiązania glutaminianu. Antagoniści bezkompetyjni (w tym wybrany przeze mnie związek MK-801) działają jako blokery kanału receptora NMDA. Kolejną grupą są

antagoniści miejsca GLY_B , do których zaliczamy zastosowany w moim eksperymencie związek L-701,324. Wybrane przeze mnie związki prezentowały kilka możliwych sposobów osłabienia aktywności receptora NMDA. Wyniki mojego doświadczenia pokazały, że istnieje synergizm działania pomiędzy cynkiem, a każdą z wymienionych tu dróg prowadzących do obniżenia funkcji receptora NMDA.

Potwierdzeniem moich eksperymentów są badania z użyciem D-seryny. Wykazano, że aktywacja miejsca glicynowego w kompleksie receptora NMDA wywołana przez ten związek znosi aktywność cynku w teście Porsolta u myszy [Poleszak i wsp. 2008].

UDZIAŁ RECEPTORA AMPA W MECHANIZMIE PRZECIWDEPRESYJNEJ AKTYWNOŚCI JONÓW CYNKU

Nie tylko inhibicja receptora NMDA, ale też aktywacja receptora AMPA są zaangażowane w mechanizm działania przeciwdepresyjnego [Skolnick i wsp. 2001, Li i wsp. 2001, 2003, Mareng i wsp. 2008]. Potencjalizatory receptora AMPA wykazują działanie przeciwdepresyjne w zwierzęcych modelach depresji [Li i wsp. 2001]. W dodatku czyste potencjalizatory AMPA (tzw. AMPAkiny) silnie stymulują produkcję BDNF [Skolnick i wsp. 2001, Li i wsp. 2003]. Największe zagęszczenie receptorów AMPA (kora przedczołowa, hipokamp) obejmuje struktury odpowiedzialne za regulację nastroju i bezpośrednio związane z patofizjologią depresji [Bleakman i wsp. 2007]. Aktywacja receptora AMPA, według najnowszej hipotezy Skolnicka może stanowić wspólny punkt końcowy działania antagonistów NMDA [Skolnick i wsp. 2008]. Blokada receptorów presynaptycznych, czy też heteroreceptorów na GABA-ergicznym interneuronach przez antagonistów NMDA może w rzeczywistości prowadzić do zwiększenia stężenia glutaminianu w szczelinie synaptycznej. Podwyższony poziom glutaminianu może z kolei aktywować receptory AMPA indukując aktywność przeciwdepresyjną. Teorię tą potwierdzają badania behawioralne, w których działanie przeciwdepresyjne antagonistów NMDA (ketamina, MK-801) było znoszone przez związek NBQX, antagonistę receptora AMPA [Maeng i wsp. 2008].

Jednym z pozytywnych modulatorów receptora AMPA jest antagonist receptoru NMDA - cynk. Jony cynku w niskich stężeniach (30 μM) wzmagają aktywność receptora

AMPA, natomiast w stężeniach wyższych (mM) hamują go przez bezpośrednią blokadę kanału jonowego [Rassendren i wsp. 1990].

W moim eksperymencie użyłam związku NBQX, aby zbadać udział receptorów AMPA w mechanizmie przeciwdepresyjnej aktywności cynku. Stwierdziłam zablokowanie efektu przeciwdepresyjnego cynku w teście pływania po uprzednim zastosowaniu antagonisty receptora AMPA - NBQX. Otrzymane wyniki sugerują, że w mechanizm działania antydepresyjnego cynku, analogicznie jak niektórych antagonistów receptora NMDA, zaangażowane są glutaminianergiczne receptory jonotropowe AMPA.

Kolejnym krokiem podjętym w niniejszej pracy było zastosowanie związku CX 614 – pozytywnego allosterycznego modulatora receptora AMPA, aby sprawdzić, czy występuje synergizm działania z jonami cynku w teście pływania u myszy. Związki podano w niskich, nieaktywnych w FST dawkach. Otrzymałam słaby, ale znamienny efekt przeciwdepresyjny w tym teście, świadczący o wzajemnym potęgowaniu działania jonów cynku i badanej AMPAkiny.

W świetle najnowszej wiedzy patofizjologia i symptomatologia depresji mogą być rozumiane jako odzwierciedlenie uszkodzenia neuronów powstającego w warunkach szeroko rozumianego stresu: nadmiernej aktywacji receptorów NMDA oraz zaburzenia równowagi w układzie glutamatergicznym (zaburzenia proporcji aktywności poszczególnych receptorów jonotropowych). Cynk tworzy jedno z podstawowych zabezpieczeń chroniących neurony przed nadmierną aktywacją receptorów NMDA [Frederickson i wsp. 2005], a efektywność suplementacji cynkiem w klinice można tłumaczyć między innymi jego antagonistycznym wpływem na jonotropowe receptory dla glutaminianu typu NMDA/AMPA.

BRAK WPŁYWU PRZEWLEKŁYCH PODAŃ CYNKU NA POWSTAWANIE ZMIAN ADAPTACYJNYCH RECEPTORÓW METABOTROPOWYCH GLU 5

Potencjalną funkcją receptorów metabotropowych dla glutaminianu w terapii depresji jest modulacja transmisji glutaminianergicznej. Odbywa się ona poprzez presynaptyczną

regulację uwalniania neuroprzekaźnika lub poprzez modulację postsynaptycznej odpowiedzi na glutaminian i regulację pobudliwości neuronalnej [Pin i wsp. 1995].

Antagoniści I grupy receptorów mGluR (MPEP, MTEP, AIDA) wykazują aktywność przeciwdepresyjną w testach behawioralnych (FST, TST), a MTEP i MPEP dodatkowo w modelu bulbektomii [Pilc i wsp. 2002, Tatarczyńska i wsp. 2001, Wierońska i wsp. 2002]. Myszy pozbawione receptora mGlu5 (tzw. mGluR5 „*knock-out*”) posiadają fenotyp cechujący się zachowaniami pro- depresyjnymi (znacząco zwiększony czas bezruchu w teście wymuszonego pływania) [Lii wsp. 2006].

Mechanizm działania LPD jest powiązany ze zmianami adaptacyjnymi w obrębie grupy I receptorów mGluR. Powtarzalna ekspozycja na LPD obniża wrażliwość grupy I mGluR w mózgu. Wielokrotne podania imipraminy lub elektrowstrząsów powodują spadek wrażliwości komórek hipokampa w obszarze CA1 na agonistów receptorów grupy I mGluR- ACPD, DHPG [Pilc i wsp. 2007]. Długotrwałe stosowane ECS powodują zwiększenie immunoreaktywności receptorów mGluR1 w hipokampie, a szczególnie w regionie CA3. Zaobserwowano też, że chroniczne podania imipraminy zwiększają ekspresję mRNA dla receptorów mGluR5 w obszarze CA1 hipokampa, a wielokrotne ECS w rejonie CA3 [Śmiałowska i wsp. 2002]. Uważa się, że ta „*up*”- regulacja może odzwierciedlać mechanizm kompensacyjny w stosunku do spadku wrażliwości receptorów po terapii przeciwdepresyjnej [Pilc i wsp. 2007]. Chroniczny łagodny stres u szczurów podnosi poziom białka receptorowego mGluR5 w obszarze CA1 hipokampa potwierdzając zaangażowanie tego podtypu receptora w patofizjologię depresji [Pilc i wsp. 2007]. O powiązaniu z depresją świadczy też sama lokalizacja zmian adaptacyjnych receptorów I grupy mGluR, obejmująca obszar najbardziej charakterystyczny dla powstawania zmian patologicznych w depresji - formację hipokampa [Nestler i wsp. 2002].

Jednym z możliwych mechanizmów uzyskiwania aktywności przeciwdepresyjnej przez jony cynku jest ich działanie pośrednie na receptor NMDA, poprzez antagonistyczny wpływ na receptory I grupy mGluR [Zirpel i wsp. 2001]. Antagoniści grupy I mGluR (mGluR1, mGluR5) posiadają, bowiem zdolność zmniejszenia aktywności receptora NMDA [Pałucha i wsp. 2002]. Badania przeprowadzone przez Pomierny-Chamioło wykazały, że związek MTEP (selektywny antagonist receptor mGluR5) podawany chronicznie, podobnie jak imipramina znamienne zwiększa gęstość receptorów mGluR5 w hipokampie i korze mózgowej szczura [Pomierny- Chamioło 2008].

Wyniki przeprowadzonego przeze mnie eksperymentu nie wykazały jednak żadnych, istotnych statystycznie zmian w gęstości receptorów mGluR5 pod wpływem chronicznych

podają cynku. Analizowaną strukturą była kora mózgowa. Być może zmiany takie zachodzą w hipokampie, co wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach.

ROLA UKŁADU ADRENERGICZNEGO W PRZECIWDEPRESYJNEJ AKTYWNOŚCI JONÓW CYNKU

Mechanizmy adaptacji do nagłego podwyższenia stężenia monoamin stanowią niezwykle istotny element działania terapeutycznego LPD. Teorie depresji oparte na mechanizmach receptorowych mogą być uznawane za przejaw plastyczności neuronalnej. Pierwszą opisaną [Vetulani i wsp. 1975], a zarazem najlepiej udokumentowaną zmianą adaptacyjną po LPD w układach neuroprzekaźnikowych jest β -adrenergiczna „down-regulacja”. Przejawia się ona zmniejszeniem gęstości i/lub wrażliwości receptorów β -adrenergicznych w obszarach limbicznych mózgu oraz spadkiem syntezy cAMP aktywowanej noradrenaliną. Zjawisko to, wywoływane przez LPD należące do różnych grup (TLPD, IMAO, nietypowe, wyjątek SSRI), [Vetulani i wsp. 1975, Sulser i wsp. 1978, Neliat i wsp. 1996, Nalepa i wsp. 1996, Harkin i wsp. 2000] oraz ESC, jest tak charakterystyczne, że prawie stało się swoistym markerem wykrywającym aktywność przeciwdepresyjną badanych substancji [Duncan i wsp. 1985, Leonard 1997]

Ponieważ dane pochodzące zarówno z doświadczeń na zwierzętach, jak i badań klinicznych dowodzą, że cynk posiada aktywność przeciwdepresyjną, postanowiłam sprawdzić, czy jon ten będzie wywoływał „ β -down”-regulację w układzie noradrenergicznym w korze mózgowej myszy. Wyniki moich badań wykazały zmniejszenie wiązania liganda do receptorów β -adrenergicznych pod wpływem dwutygodniowych podań cynku, a zmiana ta była statystycznie istotna. Otrzymane wyniki sugerują podobieństwo zmian adaptacyjnych w przypadku receptorów β pomiędzy terapią LPD a chronicznym podaniem jonów cynku. Świadczą o zaangażowaniu układu noradrenergicznego w mechanizm przeciwdepresyjnego działania jonów cynku.

O powiązaniu cynku z receptorem β -adrenergicznym mówią również badania Swaminath [Swaminath i wsp. 2002]. Receptor β_2 -adrenergiczny przesyła odpowiedzi zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym jak i w układzie współczulnym. Odkryto, że cynk działa jako pozytywny allosteryczny modulator receptora β_2 -adrenergicznego. Efekt, jaki

wywiera cynk na funkcjonowanie tego receptora jest złożony. Wiązanie cynku do miejsca o wysokim powinowactwie, które udało się dokładnie zidentyfikować [Swaminath i wsp. 2003], zwiększa powinowactwo agonistów do receptora β_2 -adrenergicznego i ułatwia stymulowaną agonistą akumulację cAMP. Istotne znaczenie ma fakt, że efekt ten pojawia się, przy stężeniach, które mogą być osiągnięte w synapsie *in vivo*. Wiązanie cynku do miejsca o niskim powinowactwie hamuje wiązanie antagonistów [Swaminath i wsp. 2002].

Aby potwierdzić udział innych receptorów układu noradrenergicznego w przeciwdepresyjnej aktywności jonów cynku wykonałam badania zmian adaptacyjnych w receptorach α - adrenergicznych. Terapia przeciwdepresyjna może powodować powstawanie zmian adaptacyjnych w układzie α - adrenergicznym. W przypadku receptora α_1 stwierdzono „*up*”- regulację wywoływana przez szereg LPD (inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny i serotoniny, citalopram, tianeptyna i inne) [Vetulani i wsp. 1984, Nowak i wsp. 1988, Menkes i wsp. 1981]. Wykonane przeze mnie eksperymenty wykazały znamienne wzrost wiązania [^3H] Prazosyny do receptorów α_1 w korze mózgowej myszy po chronicznych podaniach cynku, a zatem zwiększenie gęstości i/lub wrażliwości receptorów α_1 .

W przypadku receptora α_2 - adrenergicznego nie wykazałam żadnych istotnych statystycznie zmian, które mogłyby uczestniczyć w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania jonów cynku.

UKŁAD SEROTONINERGICZNY W PRZECIWDEPRESYJNYM MECHANIZMIE DZIAŁANIA JONÓW CYNKU

Układ serotoninerpiczny odgrywa istotną rolę w patofizjologii depresji oraz mechanizmie działania antydepresantów. Początki hipotezy serotoninerpicznej sięgają lat 60-tych ubiegłego stulecia [Głowiński i wsp. 1964, Schildkraut 1965]. Hipoteza ta jest stale modyfikowana i dostosowywana do obecnego stanu wiedzy [Cryan i wsp. 2000]. O jej słuszności dowodzą następujące dane:

- SSRI stanowią skuteczną grupę leków w leczeniu depresji
- aktywność terapeutyczna niektórych LPD jest znoszona przez użycie pCPA (para-chloro-fenylalaninę) - inhibitora syntezy serotoniny [O'Leary i wsp. 2007]

- dieta pozbawiona tryptofanu (prekursora 5-HT) powoduje obniżenie nastroju, oraz powrót symptomów depresji u pacjentów leczonych LPD [Heniger i wsp. 1996].

Wpływ przewlekłych podań cynku na powstanie zmian adaptacyjnych receptorów układu serotonergicznego 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}

Wpływ przewlekłych podań LPD na układ serotonergiczny jest złożony i niejednoznaczny. Badania elektrofizjologiczne wskazują na nasilenie przewodnictwa serotonergicznego pod wpływem różnych LPD [Blier i wsp. 1998]. Zwiększenie aktywności receptorów 5-HT_{1A} w hipokampie może stanowić jeden z mechanizmów działania LPD. Różne klasy LPD zwiększają wrażliwość lub czynność receptorów 5-HT_{1A}, choć za sprawą różnych mechanizmów. IMAO lub SSRI zwiększają aktywność receptorów 5-HT_{1A} po dłuższej terapii, powodując desensytyzację presynaptycznych autoreceptorów. Autoreceptory te kontrolują uwalnianie serotoniny, a ich desensytyzacja powoduje wzmożenie uwalniania serotoniny i nasilenie przewodnictwa serotonergicznego. Wykazano również, że stosowanie terapii ECS powoduje zwiększenie wrażliwości postsynaptycznych receptorów 5-HT_{1A} w hipokampie i w przodomózgowiu. ECS nie wpływa natomiast na aktywność autoreceptorów 5-HT_{1A}. Zainteresowanie receptorem 5-HT_{1A} wzrosło ponownie, kiedy odkryto, że stymulacja tych receptorów przez SSRI nasila neurogenezę w hipokampie osób dorosłych [Duman 2004a, Roman 2007]. Uszkodzenie serotonergicznego jądra szwu zaburza ten proces [Olie i wsp. 2004]. U chorych na depresję, zmarłych w wyniku samobójstwa stwierdza się z kolei wzrost ekspresji receptora 5-HT_{1A} w jądrach szwu oraz obniżenie ekspresji mRNA w niektórych obszarach korowych. Podobne efekty dały badania przyżyciowe wykonane metodą PET [Roman 2007].

W badaniach radioreceptorowych w przypadku receptora 5-HT_{1A} obserwuje się zarówno obniżenie (paroksetyna) jak i wzrost (imipramina, ECS) gęstości receptorów w hipokampie po długotrwałej kuracji tymi lekami [Maj i wsp. 1996].

W przypadku receptorów 5-HT₂, naliczniej występujących w korze mózgowej, badania radioreceptorowe wskazują z kolei na obniżenie ich gęstości pod wpływem TLPD i IMAO. Efekt przeciwny do LPD na receptor 5-HT_{2A} wywierają natomiast ECS. Dane odnoszące się do SSRI pozostają ze sobą w sprzeczności [Maj i wsp. 1996, 2000,

Klimek i wsp. 1994]. Badnia *postmortem* wykazały wzrost gęstości receptora 5-HT_{2A} w korze przedczołowej. Badania przyżyciowe potwierdziły wzrost wiązania ligandów do tego receptora jedynie w przypadku niektórych typów depresji [Roman 2007].

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów wykazały wzrost wiązania [³H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A} w hipokampie szczura po wielokrotnych podaniach cynku. Wyniki analizy saturacyjnej wykazały, że chroniczne podania cynku indukują wzrost gęstości receptorów 5-HT_{1A}. Zmiany te są podobne do zmian zachodzących po terapii imipraminą oraz ECS [Nowak 1997] i świadczą o udziale transmisji serotonergiczej w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania jonów cynku.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach radioreceptorowych po przewlekłych podaniach cynku zaobserwowałam wzrost wiązania [³H]Ketanseryny do receptorów 5-HT_{2A} w korze mózgowej szczura. Wyniki analizy saturacyjnej wykazały wzrost gęstości receptorów 5-HT_{2A} pod wpływem chronicznych podań cynku. Wyniki te nie przypominają zmian adaptacyjnych po terapii LPD, których efektem jest przeważnie „down”- regulacja receptorów 5-HT₂ [Duman i wsp. 2004]. Z drugiej strony nie wszystkie sposoby leczenia przeciwdepresyjnego powodują zmniejszenie liczby receptorów 5-HT₂. LPD z grupy SSRI dają wyniki rozbieżne przy zastosowaniu tej metody [Maj 2000]. Liczba receptorów 5-HT₂ w korze mózgowej nie zmniejsza się, a zwiększa po przewlekłej terapii elektrowstrząsowej, która jest jedną z najskuteczniejszych metod leczenia depresji. W przypadku ECS zmiany te są charakterystyczne jedynie dla samców, zmian podobnych nie wykazano u samic. W pewnym stopniu hamowanie funkcji receptorów 5-HT_{2A} można osiągnąć przez nasilenie aktywności receptorów 5-HT_{1A} [Roman 2007].

Udział receptorów układu serotonergicznego 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A/C} w mechanizmie przeciwdepresyjnej aktywności jonów cynku - test pływania

Cynk cechuje się aktywnością przeciwdepresyjną potwierdzoną w testach behawioralnych i modelach depresji [Krocza i wsp. 2001, Szewczyk i wsp. 2002, Nowak i wsp. 2003c, Cieślik i wsp. 2007, Sowa- Kućma 2008]. Efekt przeciwdepresyjny zaobserwowano między innymi w teście pływania zarówno u myszy jak i u szczurów oraz teście zawieszenia za ogon u myszy [Krocza i wsp. 2001, Krocza i wsp. 2002, Nowak i wsp. 2003c, Rosa i wsp. 2003]. Ponadto w tych badaniach zaobserwowano, że

cynk podany w niskich, nieaktywnych w teście pływania dawkach, wraz z niskimi, nieaktywnymi w tym teście dawkami imipraminy lub citalopramu wywołuje „aktywność przeciwdepresyjną”, wyrażoną skróceniem czasu bezruchu u testowanych zwierząt (synergizm działania), [Krocza i wsp. 2001, Szewczyk i wsp. 2002]. To skierowało moją uwagę na układ serotonergiczny w kontekście mechanizmu aktywności przeciwdepresyjnej wykazywanej przez cynk. Wiadomo również, że antagoniści receptora NMDA mają zdolność uwalniania/zwiększania stężenia serotoniny oraz zwiększają obrót tego neurotransmitera w mózgu [Löschner i wsp. 1993]. Tak więc cynk poprzez interakcję z receptorem NMDA mógłby prowadzić do nasilenia uwalniania serotoniny.

Celem mojego eksperymentu było sprawdzenie, czy aktywność przeciwdepresyjna jonów cynku jest związana z układem serotonergicznym. Do badań zastosowałam antagonistę receptorów 5-HT_{1A}- WAY 100635 i 5-HT_{2A/C}- ritanserynę. Wyniki pokazały, że przeciwdepresyjny efekt cynku wykazany w teście Porsolta jest znoszony zarówno przez związek WAY 100635 jak i ritanserynę. Zaobserwowane zmiany mierzone skróceniem czasu bezruchu są istotne statystycznie. Otrzymane dane świadczą, iż obserwowany efekt przeciwdepresyjny wywołany podaniem cynku jest zależny od receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{2A/C}.

W zaprezentowanych przeze mnie wynikach, podanie nieaktywnej dawki fluoksetyny wraz z cynkiem (w dawce nieaktywnej), podobnie jak w badaniach z citalopramem [Szewczyk i wsp. 2002], znamienne statystycznie skracało czas bezruchu u testowanych myszy. Cynk potęguje zatem działanie zarówno citalopramu jak i fluoksetyny, a mechanizm tego efektu może mieć związek z nasilaniem przekazywania serotonergicznego. Dodatkowym potwierdzeniem są wyniki eksperymentów, w których wykonano u zwierząt lezje układu serotonergicznego indukowane pCPA. Redukcja stężenia serotoniny nie zmieniła podstawowej aktywności w FST, ale całkowicie zniósła aktywność przeciwdepresyjną cynku [dane w publikacji]. Ciekawych obserwacji dostarczył test wymuszonego pływania, w którym fluoksetyna w aktywnej dawce nie obniżyła czasu bezruchu u szczurów poddanych diecie bezcynkowej. Sugeruje to niższą efektywność SSRI przy niedoborze cynku i powiązanie mechanizmów działania tego pierwiastka z układem serotonergicznym [Tassabehji i wsp. 2008].

Ocena zachowania zwierząt w teście pływania pod względem zaangażowania układów serotonergicznego lub noradrenergicznego zaproponowana przez Detke [Detke 1995] wg której przeprowadziłam mój kolejny eksperyment również wskazuje na powiązanie efektu przeciwdepresyjnego cynku z systemem serotonergicznym. Nasilenie transmisji

serotonergicznej redukuje czas bezruchu i wydłuża czas pływania zwierząt, podczas gdy układ noradrenergiczny związany jest z obniżeniem czasu bezruchu i wydłużeniem czasu wspinania w FST u szczurów. W moim doświadczeniu, cynk, podobnie do fluoksetyny, poza obniżeniem czasu bezruchu, wydłużał czas pływania, ale nie wpływał na czas wspinania. Wyżej wymienione zmiany w parametrach FST wywołane przez cynk podczas tego testu sugerują raczej serotonergiczny niż adrenergiczny mechanizm przeciwdepresyjnej aktywności tych jonów.

Dane te pozostają jednak częściowo w sprzeczności z wynikami badań grupy Cunha, w których efekt synergistyczny zaobserwowano nie tylko w przypadku układu serotonergicznego, ale i noradrenergicznego oraz dopaminergicznego w teście zawieszenia za ogon (TST) u myszy [Cunha i wsp. 2008]. Na rozbieżność obserwacji wskazują także badania Garcia-Colunga i współpracowników, którzy donoszą, że cynk ułatwia wychwyty zwrotny serotoniny w ciele modzelowatym (*corpus callosum*), korze obręczy (*cingulate cortex*) i jądrze szwu (*raphe nucleus*) u szczurów. Wolny cynk może, zatem modulować zewnątrzkomórkowe stężenia serotoniny oraz proces jej usuwania z synapsy [Garcia-Colunga i wsp. 2005]. Z drugiej strony dane otrzymane z doświadczenia *in vitro*, w których badano wpływ cynku (10^{-4} M) na wiązanie [3 H]citalopramu w korze mózgowej szczura sugerują brak wpływu cynku na wychwyty 5-HT [dane niepublikowane]. Najnowsze badania radioreceptorowe przeprowadzone przez Barrondo określiły wpływ cynku na wiązanie ligandów do receptorów 5-HT_{1A} [Barrondo i wsp. 2009]. Do doświadczeń użyto zarówno antagonisty receptora 5-HT_{1A} ([3 H]WAY 100635), jak również agonistów ([3 H]8-OH-DPAT i endogennego neurotransmitera - 5-HT). Cynk w stężeniach fizjologicznych hamował wiązanie tych ligandów (agonisty/antagonisty) do receptora 5-HT_{1A} poprzez obniżanie ich powinowactwa oraz maksymalnej liczby miejsc wiążących. Cynk okazał się więc negatywnym allosterycznym modulatorem receptora 5-HT_{1A}, nie udało się jednak określić jego miejsca na tym receptorze. Znaczenie fizjologiczne modulacji receptora 5-HT_{1A} jest nadal niejasne, ale koloalizacja receptorów 5-HT_{1A} i jonów cynku w o.u.n. (hipokamp, kora mózgowa) sugeruje, że cynk uwalniany z zakończeń nerwowych wywiera taki sam efekt *in vivo*. Badania te stanowią kolejny dowód, potwierdzający, że przeciwdepresyjny mechanizm działania jonów cynku powiązany jest z układem serotonergicznym, a jony cynku mogą stanowić istotny czynnik wpływający na efektywność terapii, która zależy od aktywności receptora 5-HT_{1A}.

Interakcja cynku z układem serotonergicznym wymaga dalszych badań. Jon ten może również nasilać wiązanie agonistów (lecz nie antagonistów) do receptora 5-HT₃, osłabiać proces desensytyzacji receptora i zwiększać wielkość maksymalnych prądów jonowych przechodzących przez jego kanał [Hubbard i wsp. 2000].

W świetle zaprezentowanych wyników, najistotniejsza w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania jonów cynku wydaje się być modulacja transmisji glutaminianergicznej i serotonergicznej. Potwierdzają to pozytywne wyniki zarówno analiz biochemicznych jak i testów behawioralnych przeprowadzonych na obydwu gatunkach gryzoni (myszy, szczury). Zmiany adaptacyjne po chronicznych podaniach soli cynku w w/w układach neuroprzekaźników przypominają zmiany po terapii klasycznymi lekami przeciwdepresyjnymi i/lub elektrowstrząsami. Test wymuszonego pływania jednoznacznie wskazuje na udział receptorów NMDA, AMPA oraz 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/C} w mechanizmie przeciwdepresyjnej aktywności jonów tego biometalu. Równocześnie zaangażowanie systemów neurotransmisji serotonergicznej i glutaminianergicznej w patofizjologię i leczenie depresji pozostaje kwestią bezsporną. Konieczne natomiast pozostaje przeprowadzenie dalszych badań dotyczących wpływu cynku na metabotropowe receptory dla glutaminianu i rozstrzygnięcie udziału adrenoreceptorów w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania jonów cynku.

Reasumując, mechanizmy przeciwdepresyjnego działania cynku, wykazane w niniejszej pracy, pozwalają wysunąć przypuszczenie, iż odgrywają one istotną rolę w suplementacji cynkiem terapii przeciwdepresyjnej, szczególnie w przypadku depresji lekoopornych.

PODSUMOWANIE

1. Aktywność przeciwdepresyjna cynku w teście wymuszonego pływania (Porsolta) jest związana z hamowaniem aktywności receptorów NMDA (antagonizm agonisty NMDA i nasilanie przez antagonistów receptora NMDA) oraz transmisją informacji przez receptor AMPA (blokowanie przez antagonistę NBQX i nasilanie przez potencjatora receptora CX 614).
2. Chroniczne stosowanie cynku wywołuje redukcję powinowactwa glicyny do miejsca glicynowego w obrębie kompleksu receptora NMDA (przy zastosowaniu liganda [³H]L-689 560) w korze mózgowej szczura.
3. Aktywność przeciwdepresyjna cynku w teście wymuszonego pływania (Porsolta) jest związana z transmisją serotonergiczną (nasilanie efektu przez selektywnego inhibitora wychwyty zwrotnego serotoniny – fluoksetynę, charakterystyczny serotonergiczny efekt u szczurów) przez receptory 5-HT_{1A} (antagonizm przez WAY 100635) i przez receptory 5-HT_{2A/C} (antagonizm przez ritanserynę).
4. Chroniczne stosowanie cynku wywołuje wzrost gęstości (B_{max}) receptorów 5-HT_{1A} ([³H]8-OH-DPAT) i 5-HT_{2A} ([³H]Ketanseryny) w hipokampie i korze mózgowej szczura.
5. Chroniczne stosowanie cynku nie wpływa na wiązanie [³H]MPEP do receptora mGluR5 w korze mózgowej szczura.
6. Chroniczne stosowanie cynku wywołuje wzrost wiązania [³H]Prazosyny do receptorów α₁-adrenergicznych, nie wpływa na wiązanie [³H]Klonidyny do receptora α₂-adrenergicznego, oraz wywołuje redukcję wiązania [³H]CGP 12177 do receptora β₁-adrenergicznego w korze mózgowej myszy.

WNIOSKI

1. Mechanizm przeciwdepresyjny cynku jest związany z układem glutamatergicznym (receptory NMDA i AMPA).
2. Mechanizm przeciwdepresyjny cynku jest związany z układem serotonergicznym (receptory 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}).
3. Mechanizm przeciwdepresyjny cynku jest związany z układem noradrenergicznym (receptory α_1 - i β_1 - adrenergiczne).
4. Mechanizmy przeciwdepresyjnego działania cynku wskazują na podobieństwo tych mechanizmów do mechanizmów klasycznych leków przeciwdepresyjnych i elektrowstrząsów. Wyniki badań prezentowanych w tej rozprawie dostarczają dalszych przed-klinicznych dowodów na przeciwdepresyjną aktywność cynku oraz wskazują na możliwość potencjalizacji terapii przeciwdepresyjnej przez suplementację cynkiem.

STRESZCZENIE

Cynk, metal dwuwartościowy, bierze udział w bardzo wielu procesach komórkowych zaczynając od interakcji z palcami cynkowymi, kinazami białkowymi, a kończąc na modulacji transmisji synaptycznej. Rola cynku w ośrodkowym układzie nerwowym wydaje się być również powiązana z funkcjami umysłowymi. Staje się to szczególnie widoczne w okresach jego niedoboru, w kontekście zaburzeń takich jak lęk czy depresja. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że cynk jest związany z patofizjologią depresji. Badania przedkliniczne pokazały przeciwdepresyjną aktywność cynku w testach i modelach depresji. Największe zagęszczenie neuronów glutaminianergicznych sekwestrujących cynk lokalizuje się w strukturach, takich jak hipokamp i kora mózgowa, w których zaobserwowano postępujące zmiany morfologiczne w przebiegu depresji. Wiadomo, że cynk moduluje odpowiedź receptorów NMDA, chroniąc w ten sposób neurony przed nadmierną aktywacją. Wpływa on również na ekspresję BDNF, a pośrednio na procesy neurogenezy i plastyczności synaptycznej. Niejasny nadal natomiast pozostaje mechanizm działania przeciwdepresyjnego cynku.

Celem niniejszej pracy było określenie mechanizmów przeciwdepresyjnej aktywności jonów cynku. Badania przeprowadzono przy zastosowaniu zarówno metod biochemicznych (radioreceptorowych) jak i behawioralnych (test wymuszonego pływania). Podjęte w pracy badania koncentrowały się na układach glutaminianergicznym, serotoninerpicznym i adrenergicznym.

Pierwsza część pracy obejmowała zbadanie zmian adaptacyjnych w mózgu szczura i myszy powstałych pod wpływem przewlekłych podań cynku w mózgu szczura i myszy przy użyciu metody radioreceptorowej. W układzie glutaminianergicznym wykazano zmiany adaptacyjne polegające na zmniejszeniu powinowactwa glicyny do miejsca glicynowego receptora NMDA w korze mózgowej szczura. Nie stwierdzono zmian gęstości/wrażliwości receptorów mGluR5 w korze mózgowej szczura. W układzie serotoninerpicznym zaobserwowano zwiększenie gęstości receptorów 5-HT_{1A} (w hipokampie) i 5-HT₂ (w korze mózgowej szczura). W przypadku układu noradrenergicznego stwierdzono redukcję gęstości receptorów β -adrenergicznych oraz zwiększenie gęstości receptorów α_1 -adrenergicznych w korze mózgowej myszy. Nie wykazano istotnych statystycznie zmian dla receptorów α_2 . Zmiany adaptacyjne spowodowane chronicznym podaniem cynku są analogiczne do zmian wywoływanych

przez klasyczne leki przeciwdepresyjne (LPD) w przypadku receptorów: NMDA, 5-HT_{1A}, β- oraz α₁-adrenergicznych. Adaptacje w przypadku receptora 5-HT_{2A} przypominają natomiast zmiany po zastosowaniu jednej z najskuteczniejszych form terapii depresji - elektrowstrząsów.

W drugiej części pracy zastosowano test wymuszonego pływania w celu określenia zaangażowania układów glutaminianergicznego i serotonergicznego w mechanizm przeciwdepresyjnego działania jonów cynku. Wyniki tych eksperymentów wykazały, że aktywność przeciwdepresyjna cynku jest zależna od aktywności receptorów NMDA oraz AMPA, jak też od aktywności receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{2A/C}.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy wskazują na pewne podobieństwa mechanizmu działania cynku i LPD, co potwierdza możliwość zastosowania cynku w terapii klinicznej. Szczególnie istotnego znaczenia może nabierać ten biometal w aspekcie terapii depresji lekoopornych, gdzie jego funkcja polegać miałaby na potęgowaniu działania przeciwdepresyjnego innych LPD, nieskutecznych w monoterapii. Ponadto wśród chorych na depresję istnieje wiele subpopulacji o zróżnicowanych cechach psychopatologicznych i biochemicznych. Jedną z nich wydaje się być depresja z obniżonym poziomem cynku we krwi. U tych pacjentów suplementacja cynkiem miałaby kluczowe znaczenie w efektywności terapii.

W kontekście danych wskazujących na fakt, że prawie połowa populacji ludności na świecie nie otrzymuje odpowiedniej ilości cynku, przy wzrastającej zachorowalności na depresję, określenie mechanizmów aktywności przeciwdepresyjnej jonów cynku staje się niezwykle istotne dla zmniejszenia ekspansji w/w schorzenia.

ABSTRACT

Zinc, a divalent metal, is involved in a myriad of cellular processes, ranging from interactions with zinc- finger proteins and protein kinases to modulation of synaptic neurotransmission. It is possible that zinc function is linked to the mental function. It seems to be especially important in zinc deficiency in the context of psychiatric diseases, such as anxiety and depression. Recent data indicated that zinc is implicated in pathophysiology of depression and the mechanism of action by antidepressant drugs. Preclinical studies showed the antidepressant-like activity of zinc in tests and models of depression. The greatest concentration of zinc sequestering glutamatergic neurons is localized in structures, such as hippocampus and cortex, in which progressive morphological changes are being observed during depression illness. Zinc modulates responses from NMDA receptors; protect on this way neurons from excessive activity. It also affects the BDNF expression and indirectly neurogenesis and synaptic plasticity. However, the exact zinc antidepressant mechanism of action remains unknown.

The aim of this study was to investigate the mechanism of antidepressant zinc activity. Experiments were carried out by using both: biochemical (radioligand binding assay) and behavioral (forced swim test) methods. Experiments were directed on glutamatergic, serotonergic and adrenergic systems.

First part examined several adaptive changes after repeated zinc treatment in rodent brains using radioreceptor methods. In glutamatergic system adaptive changes (reduction in glycine affinity to glycine site of the NMDA receptor complex) in rat cortex were shown. Multiple zinc administration had no effect on the density/affinity of mGluR5 receptors. In serotonergic system 5-HT_{1A} “up”- regulation (in hippocampus) and 5-HT₂ “up”- regulation (in cerebral cortex) were observed. The results of our studies also shown a „β- down” and „α₁- up”- regulation in the mouse cerebral cortex. No changes were shown in α₂- adrenoceptors.

Adaptive changes in NMDA, 5-HT_{1A}, β- and α₁- adrenergic receptors caused by chronic zinc administration are similar to these alterations induced by conventional antidepressant drugs. On the other hand, adaptation in 5-HT_{2A} receptors, is similar to changes induced by electroconvulsive shocks, one of the most effective treatment of depression.

In the second part forced swim test was used to estimate the involvement of glutamatergic and serotonergic systems in antidepressant zinc action. Results demonstrated that antidepressant zinc activity is dependent on NMDA, AMPA, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptor's activity.

Results presented in this dissertation indicate some similarities in the mechanisms of action of zinc and classic antidepressant drugs that confirms possibility of using zinc in the clinical therapy. It seems to be especially important in the therapy of treatment-resistant depression, in which zinc may augment antidepressants' effect, inefficient in monotherapy. Moreover, there are many subpopulations with a variety of psychopathological and biochemical features among people suffering from depression. One of them seems to be depression with lowered serum zinc level. In those patients zinc supplementation may be crucial for therapy efficacy enhancement.

In the context of the available data which indicates that almost half of the world human population are not receiving an adequate amount of zinc and increasing prevalence of depression, the determination of mechanisms of antidepressant zinc action becomes really important to reduce this illness expansion.

PIŚMIENNICTWO

1. Abraham G, Milev R, Stuart LJ (2006) T3 augmentation of SSRI resistant depression. *J Affect Disord.* 91: 211–215.
2. Agam G, Everall IP, Belmaker RH, (red.). *The postmortem brain in psychiatric research.* Boston: Kluwer Academic, 341-62.
3. Altamura C, Maes M, Dai J, Meltzer HY (1995) Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *Eur Neuropsychopharmacol.* 5 Suppl:71-5.
4. Altamura CA, Mauri MC, Ferrara A, Moro AR, D'Andrea G, Zamberlan F (1993) Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. *Am J Psychiatry* 150:1731-3.
5. Angelucci F, Brenè S, Mathé AA (2005) BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* 10:345-52.
6. Anisman H, Merali Z, Hayley S (2008) Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 85:1-74.
7. Anisman H, Merali Z, Poulter MO, Hayley S (2005) Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Curr Pharm* 11: 963-72.
8. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol.* 160:1-12.
9. Aronson R, Offman HJ, Joffe RT, Naylor CD (1996) Triiodothyronine augmentation in the treatment of refractory depression. A meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 53:842–848.
10. Arora RC, Meltzer HY (1989) Serotonergic measures in the brains of suicide victims: 5-HT₂ binding sites in the frontal cortex of suicide victims and control subjects. *Am J Psychiatry* 146:730-6.
11. Assaf SY, Chung SH (1984) Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature.* 308:734-6.
12. Avent P, Leonardon J, Barnard F, Graham D, Depoortere H, Scatton B (1997) Antagonist properties of eliprodil and other NMDA receptor antagonists rat

- NR1A/NR2A and NR1A/NR2B receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett.* 223:133-36.
13. Avissar S, Nechamkin Y, Roitman G, Schreiber G (1997) Reduced G protein functions and immunoreactive levels in mononuclear leukocytes of patients with depression. *Am J Psychiatry* 154:211-7.
 14. Barberis A, Cherubini E, Mozrzymas JW (2000) Zinc inhibits miniature GABAergic currents by allosteric modulation of GABA A receptor gating. *J. Neurosci.* 20:8618-27.
 15. Barbon A, Popoli M, La Via L, Moraschi S, Vallini I, Tardito D, Tiraboschi E, Musazzi L, Giambelli R, Gennarelli M, Racagni G, Barlati S (2006) Regulation of editing and expression of glutamate alpha-amino-propionic-acid (AMPA)/kainate receptors by antidepressant drugs. *Biol Psychiatry* 59:713-20.
 16. Barrondo S, Salles J (2009) Allosteric modulation of 5-HT_{1A} receptors by zinc: binding studies. *Neuropharmacology* 56:455-62.
 17. Bauer M, Bschor T, Kunz D, Berghofer A, Strohle A, Muller-Oerlinghausen B (2000) Double-blind, placebo-controlled trial of the use of lithium to augment antidepressant medication in continuation treatment of unipolar major depression. *Am J Psychiatry* 157:1429–1435.
 18. Bauer M, Dopfmer S (1999) Lithium augmentation in treatment-resistant depression: meta-analysis of placebo-controlled studies. *J Clin Psychopharmacol.* 19:427–434.
 19. Bauer M, Whybrow PC, Angst J, Versiani M, Moller HJ (2002) World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders, Part 1: Acute and continuation treatment of major depressive disorder. *World J Biol Psychiatry* 3:5–43.
 20. Belanoff JK, Rothschild AJ, Cassidy F, DeBattista C, Baulieu EE, Schold C, Schatzberg AF (2002) An open label trial of C-1073 (mifepristone) for psychotic major depression. *Biol Psychiatry* 52:386-92.
 21. Berlim MT, Turecki G (2007) What is the meaning of treatment resistant/refractory major depression (TRD)? A systematic review of current randomized trials. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17:696-707.
 22. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47(4):351-4.

23. Betz H, Gomeza J, Armsen W, Scholze P, Eulenburg V (2006) Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans.* 34:55-8.
24. Beyersmann D, Haase H (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals.* 14:331-41.
25. Bleakman D, Alt A, Witkin JM (2007) AMPA receptors in the therapeutic management of depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6:117-26.
26. Blendy JA (2006) The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 59:1144-50.
27. Boireau A, Bordier F, Durand G, Doble A (1996) The antidepressant metopramine is a low-affinity antagonist at N-methyl-D-aspartic acid receptors. *Neuropharmacology.* 35:1703-7.
28. Borsini F, Meli A (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94:147-160.
29. Bourin M, Chenu F, Ripoll N, David DJ (2005) A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav Brain Res.* 164:266-9.
30. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002) Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function. *International Union of Pharmacology. XXXIII Pharmacol. Rev.* 54:247-64.
31. Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC (2003) GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol. Psychiatry* 8:721-37.
32. Bremner JD (2006) Stress and brain atrophy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:503-12.
33. Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Nazeer A, Adil J, Khan S, Staib LH, Charney DS (2002) Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. *Biol Psychiatry* 51:273-9.
34. Breslin NA (1998) Choroby afektywne. Scully JH (red) *Psychiatria: Urban & Partner, Wrocław* 111-131.
35. Birinyi A, Parker D, Antal M, Shupliakov O (2001). Zinc co-localizes with GABA and glycine in synapses in the lamprey spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 433:208–21.

36. Brocardo PS, Assini F, Franco JL, Pandolfo P, Müller YM, Takahashi RN, Dafre AL, Rodrigues AL (2007) Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicol Sci.* 97:140-8.
37. Brooks-Kayal AR et al. (2001) γ -Aminobutyric acid A receptor subunit expression predicts functional changes in hippocampal dentate granule cells during postnatal development. *J. Neurochem.* 77:1266-78.
38. Bylund DB, Yamamura HI (1990) Methods for receptor binding. *Methods in neurotransmitter receptor analysis.* Ed. Yamamura HI New York 1-35.
39. Cameron HA, Tanapat P, Gould E (1998) Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 82:349-54.
40. Carroll BJ, Cassidy F, Naftolowitz D, et al. (2007) Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 433:90-103.
41. Carvalho AF, Cavalcante JL, Castelo MS, Lima MC (2007) Augmentation strategies for treatment-resistant depression: a literature review. *J Clin Pharm Ther.* 32:415-28.
42. Casagrande S, Valle L, Cupello A, Robello M (2003) Modulation by Zn²⁺ and Cd²⁺ of GABAA receptors of rat cerebellum granule cells in culture. *Eur. Biophys. J.* 32:40-46.
43. Castrén E (2005) Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci.* 6:241-6.
44. Castrén E, Võikar V, Rantamäki T (2007) Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol.* 7:18-21.
45. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50:260-5.
46. Christine CW, Choi DW (1990) Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci* 10: 108-16.
47. Cieślik K, Klen-Majewska B, Danilczuk Z, Wróbel A, Lupina T (2007) Influence of zinc supplementation on imipramine effect in a chronic unpredictable stress (CUS) model in rats. *Pharmacol Rep.* 59:46-52.
48. Cohen-Kfir E, Lee W, Eskandari S, Nelson N (2005) Zinc inhibition of gamma-aminobutyric acid transporter 4 (GAT4) reveals a link between excitatory and inhibitory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:6154-59.

49. Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA (2002) cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci.* 22:3262-8.
50. Coppen A (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br. J. Psychiatry* 113:1237-64.
51. Coulter DA (2001) Epilepsy-associated plasticity in γ -aminobutyric acid receptor expression, function and inhibitory synaptic properties. *Int. Rev. Neurobiol.* 45:237-52.
52. Coupland NJ, Ogilvie CJ, Hegadoren KM, Seres P, Hanstock CC, Allen PS (2005) Decreased prefrontal myo-inositol in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 57:1526-34.
53. Cousins RJ (1985) Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 65:238-309.
54. Cousins RJ, McMahon RJ (2000) Integrative aspects of zinc transporters. *J.Nutr.*130:1384-87.
55. Cowen PJ, McCance SL, Ware CJ, Cohen PR, Chalmers JS, Julier DL (1991) Lithium in tricyclic-resistant depression. Correlation of increased brain 5-HT function with clinical outcome. *Br. J. Psychiatry* 159: 341–346.
56. Cryan JF, (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 23:238-45.
57. Cryan JF, Kaupmann K (2005) Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol Sci.* 26:36-43.
58. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 29:571-625.
59. Cunha MP, Machado DG, Bettio LE, Capra JC, Rodrigues AL (2008) Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12:1913-20.
60. Danysz W, Frankiewicz I, Sopala M (2004) Receptory glutaminianergiczne. Nowak ZJ, Zawilska JB (red.) *Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału.* Warszawa 382-414.

61. Detke MJ, Lucki I (1996) Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res.* 73:43-6.
62. Doble BW, Woodgett JR (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 116:1175-86.
63. Dreixler JC, Leonard JP (1997) Effects of external calcium on zinc modulation of AMPA receptors. *Brain Res.* 752:170-4.
64. D'Sa C, Duman RS (2002) Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord.* 4:183-94.
65. Dudek D, Zięba A (2002) Wstęp. Dudek D, Zięba A (red.) *Depresja. Wiedzieć, aby pomóc.* Wydawnictwo Medyczne, Kraków 9-19.
66. Duman RS (2004a) Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med.* 5:11-25.
67. Duman RS (2004b) Teorie patofizjologiczne depresji – od monoamin do neuroplastyczności. Olie JP, Costa e Silva JP, Macher JP (red.). *Neuroplastyczność. Patofizjologia depresji w nowym ujęciu.* Gdańsk: Via Medica 9-20.
68. Duman RS (2005) Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. *Neurobiol Aging.* 26 Suppl 1:88-93.
69. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54:597-606.
70. Duncan GE, Paul IA, Harden TK, Mueller RA, Stumpf WE, Breese GR (1985) Rapid down regulation of beta adrenergic receptors by combining antidepressant drugs with forced swim: a model of antidepressant-induced neural adaptation. *J Pharmacol Exp Ther.* 234:402-8.
71. Dybała M, Maciag D, Cichy A, Pomierny-Chamiolo L, Partyka A, Librowski T, Nowak G (2006) Medium supplementation with zinc enables detection of imipramine-induced adaptation in glycine/NMDA receptors labeled with [3H]L-689,560. *Pharmacol Rep.* 58:753-7.
72. Dybała M, Siwek A, Poleszak E, Pilc A, Nowak G (2008) Lack of NMDA-AMPA interaction in antidepressant-like effect of CGP 37849, an antagonist of NMDA receptor, in the forced swim test. *J Neural Transm.* 115:1519-20.
73. Elhwuegi AS (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:435-51.

74. Erreger K, Traynelis SF (2005) Allosteric interaction between zinc and glutamate binding domains on NR2A causes desensitization of NMDA receptors. *J Physiol.* 569:381-93.
75. Erreger K, Traynelis SF (2008) Zinc inhibition of rat NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors. *J Physiol.* 2008 586:763-78.
76. Fink M (1991) A trial of ECT is essential before a diagnosis of refractory depression is made. Amsterdam, J.D. (red.), *Advances in Neuropsychiatry and Psychopharmacology.* Raven Press, New York 87-92.
77. Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron.* 19:1031-47.
78. Folstein M, Liu T, Peter I, et al. (2007) The homocysteine hypothesis of depression. *Am J Psychiatry* 164:861-7.
79. Franco JL, Posser T, Brocardo PS, Trevisan R, Uliano-Silva M, Gabilan NH, Santos AR, Lleal RB, Rodrigues AL, Farina M, Dafre AI (2008) Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect of zinc. *Behav Brain Res.* 188:316-323.
80. Frederickson CJ (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol.* 31:145-238.
81. Frederickson CJ (2003) Imaging zinc: old and new tools. *Sci STKE.* 182:18.
82. Frederickson CJ, Bush AI (2001) Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. *Biometals.* 14: 353-66.
83. Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 6:449-62.
84. Frederickson CJ, Maret W, Cuajungco MP (2004) Zinc and excitotoxic brain injury: a new model. *Neuroscientist.* 10:18-25.
85. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB (2000) Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron *J. Nutr.* 130:1471-1483.
86. Fuchs E (2004) Zwierzące modele depresji. Olie JP, Costa e Silva JP, Macher JP (red.). *Neuroplastyczność. Patofizjologia depresji w nowym ujęciu.* Gdańsk: Via Medica 33-46.

87. Fumagalli F, Molteni R, Calabrese F, Frasca A, Racagni G, Riva MA (2005) Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *J Neurochem.* 93:1551-60.
88. Garcia-Colunga J, Reyes-Haro D, Godoy-Garcia IU, Miledi R (2005) Zinc modulation of serotonin uptake in the adult rat corpus callosum. *J Neurosci Res.* 80: 145-149.
89. Gašior M, Czuczwar S (2004) Receptory GABA. Nowak ZJ, Zawilska JB (red.) Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Warszawa 2004: 365-82.
90. Gould E, Tanapat P (1999) Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry.* 46:1472-9.
91. Gould TD, Manji HK (2005) Glycogen Synthase Kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacol.* 30:1223-37.
92. Hallström C, McClure N (2007) Depresja. Odpowiedzi na pytania. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2-3.
93. Hansen CR Jr, Malecha M, Mackenzie TB, Kroll J (1983) Copper and zinc deficiencies in association with depression and neurological findings. *Biol Psychiatry.* 18:395-401.
94. Harkin AJ, Bruce KH, Craft B, Paul IA (1999) Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol.* 372:207-13.
95. Harkin A, Nally R, Kelly JP, Leonard BE (2000) Effects of reboxetine and sertraline treatments alone and in combination on the binding properties of cortical NMDA and 1-adrenergic receptors in an animal model of depression. *J Neural Transm.* 107:1213-27.
96. Harrison NL, Gibbons SJ (1994) Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand-and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* 33:935-52.
97. Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12:656-70.
98. Heniger 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.

99. Hensler JG (2002) Differential regulation of 5-HT_{1A} receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacol.* 26:565-73.
100. Hisaoka K, Takebayashi M, Tsuchioka M, Maeda N, Nakata Y, Yamawaki S (2007) Antidepressants increase glial cell line-derived neurotrophic factor production through monoamine-independent activation of protein tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase in glial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 321:148-57.
101. Holsboer F, Ising M (2008) Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 583:350-7.
102. Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW (2007). GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 148:13–20.
103. Hori N, Galeno T, Carpenter DO (1987) Responses of pyriform cortex neurons to excitatory amino acids: voltage dependence, conductance changes and effects of divalent cations. *Cell Mol Neurobiol.* 7:73-90.
104. Hosie AM, Dune EL, Harvey RJ, Smart TG (2003) „Zinc- mediated inhibition of GABA_A receptors: discrete binding sites underline subtype specificity.” *Nature Neurosci.* 6:362-69.
105. Hubbard PC, Lummis S.C. (2000) Zn(2+) enhancement of the recombinant 5-HT(3) receptor is modulated by divalent cations. *Eur J Pharmacol.* 394:189-97.
106. Ilouz R, Kaidanovich O, Gurwitz D, Finkelman-Eldar H (2002) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by divalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc. *Biochem Biophys Res Comm.* 295:102-6.
107. Iosifescu DV, Nierenberg AA, Mischoulon D (2005) An open study of triiodothyronine augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors in treatment-resistant major depressive disorder. *J Clin Psychiatry* 66: 1038–42.
108. Ising M, Holsboer F (2007) CRH-sub-1 receptor antagonists for the treatment of depression and anxiety. *Exp Clin Psychopharmacol.* 15:519-28.
109. Izumi Y, Auberson YP, Zorumski CF (2006) Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors. *J Neurosci.* 26:7181-8.

110. Jefferys D, Funder J (1996) Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol.* 295:131-5.
111. Joca SR, Guimarães FS (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl).* 185:298-305.
112. Joca SR, Padovan CM, Guimarães FS (2003) Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res.* 978:177-84.
113. Ju P, Aubrey KR, Vandenberg RJ (2004) Zn²⁺ inhibits glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *J Biol Chem.* 279:22983-91.
114. Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R (2005) Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res* 136:29-37.
115. Karolewicz B, Bruce KH, Lee B, Paul IA (1999) Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 2. Chronic treatment results in downregulation of cortical beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 372:215-20.
116. Kessler RC, Berglund P, Demler O (2003) The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289:3095-105.
117. Ketterman JK, Li YV (2008) Presynaptic evidence for zinc release at the mossy fiber synapse of rat hippocampus. *J Neurosci Res.* 86:422-34.
118. Kim JS, Schmid-Burgk W, Claus D, Kornhuber HH (1982) Increased serum glutamate in depressed patients. *Arch Psychiatr Nervenkr.* 232:299-304.
119. Kim TY, Hwang JJ, Yun SH, Jung MW, Koh JY (2002) Augmentation by zinc of NMDA receptor-mediated synaptic responses in CA1 of rat hippocampal slices: mediation by Src family tyrosine kinases. *Synapse* 46:49-56.
120. Kim YK, Na KS, Shin KH, Jung HY, Choi SH, Kim JB (2007) Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1044-53.
121. Kozisek ME, Middlemas D, Bylund DB (2008) Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther.* 117:30-51.
122. Kozlovsky N, Matar MA, Kaplan Z, Kotler M, Zohar J, Cohen H (2007) Long-term down-regulation of BDNF mRNA in rat hippocampal CA1 subregion

- correlates with PTSD-like behavioural stress response. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:741-58.
123. Krocza B, Branski P, Pałucha A, Pilc A, Nowak G (2001) Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test. *Brain Res Bull.* 55:297-300.
124. Krocza B, Nowak G (2001) Rola cynku w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. *Cynk w fizjologii, patofizjologii i terapii depresji*, IF PAN. Red. Nowak G, Kraków 91-109.
125. Krocza B, Zieba A, Dudek D, Pilc A, Nowak G (2000) Zinc exhibits an antidepressant-like effect in the forced swimming test in mice. *Pol J Pharmacol.* 52:403-406.
126. Lamont SR, Paulls A, Stewart CA (2001) Repeated electroconvulsive stimulation, but not antidepressant drugs, induces mossy fibre sprouting in the rat hippocampus. *Brain Res.* 893: 53-58.
127. Law AJ, Deakin JF (2001) Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *Neuroreport* 12:2971-4.
128. Law W, Kelland EE, Sharp P, Toms NJ (2003) Characterisation of zinc uptake into rat cultured cerebrocortical oligodendrocyte progenitor cells. *Neurosci Lett.* 352: 113-116.
129. Layer RT, Popik P, Olds T, Skolnick P (1995) Antidepressant-like actions of the polyamine site NMDA antagonist, eliprodil (SL-82.0715). *Pharmacol Biochem Behav.* 52:621-7.
130. Lee J, Seroogy KB, Mattson MP (2002) Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.* 80:539-47.
131. Lee R, Geraciotti TD, Kasckow JW, Coccaro EF (2005) Childhood trauma and personality disorder: positive correlation with adult CSF corticotropin-releasing factor concentrations. *Am J Psychiatry* 162:995-7.
132. Lehmann HM, Brothwell BB, Volak LP, Bobilya DJ (2002) Zinc status influences zinc transport by porcine brain capillary endothelial cells. *J Nutr.* 132: 2763-68.
133. Leonard BE (1997) Noradrenaline in basic models of depression. *Eur Neuropsychopharmacol.* 7 Suppl 1:S11-6.
134. Lespérance F, Frasurre-Smith N, Koszycki D, et al. (2007) Effects of citalopram and interpersonal psychotherapy on depression in patients with coronary artery

- disease: the Canadian Cardiac Randomized Evaluation of Antidepressant and Psychotherapy Efficacy (CREATE) trial. *JAMA* 297:367-79.
135. Levine J, Panchalingam K, Rapoport A, Gershon S, McClure RJ, Pettegrew JW (2000) Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 47:586-93.
 136. Li X, Need AB, Baez M, Witkin JM (2006) Metabotropic glutamate 5 receptor antagonism is associated with antidepressant-like effects in mice. *J. Pharmacol Exp Ther*. 319:254-9.
 137. Li X, Tizzano JP, Griffey K, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P (2003) Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). *Neuropharmacology* 40:1028-33.
 138. Li X, Witkin JM, Need AB, Skolnick P (2003) Enhancement of antidepressant potency by a potentiator of AMPA receptors. *Cell Mol Neurobiol*. 23:419-30.
 139. Li Y, Hough CJ, Frederickson CJ, Sarvey JM (2001) Induction of mossy fiber CA3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn²⁺. *J Neurosci*. 21:8015-25.
 140. Li YV, Hough CJ, Sarvey J (2003) Do we need zinc to think? *Sci STKE*. 182:19.
 141. Linkous DH, Flinn JM, Koh JY, Lanzirrotti A, Bertsch PM, Jones BF, Giblin LJ, Frederickson CJ (2008) Evidence that the ZNT3 protein controls the total amount of elemental zinc in synaptic vesicles. *J Histochem Cytochem*. 56:3-6.
 142. Liuzzi JP, Cousins RJ (2004) Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr*. 24:151-72.
 143. Loland CJ, Grånäs C, Javitch JA, Gether U (2004) Identification of intracellular residues in the dopamine transporter critical for regulation of transporter conformation and cocaine binding. *J Biol Chem*. 279:3228-38.
 144. Longstaff (2000) *Biologia molekularna receptorów*. Wróbel A. (red.) Krótkie wykłady. *Neurobiologia*. Warszawa 59-65.
 145. Löscher W, Annies R, Hönack D (1993) Comparison of competitive and uncompetitive NMDA receptor antagonists with regard to monoaminergic neuronal activity and behavioural effects in rats. *Eur J Pharmacol*. 242:263-74.
 146. Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:11062-7.

147. Lucki I (1997) The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol.* 8:523-32.
148. MacMaster FP, Russell A, Mirza Y, et al. (2006) Pituitary volume in treatment-naïve pediatric major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 60:862-6.
149. MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, et al. (2003) Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1387-92.
150. Madry C, Mesic I, Betz H, Laube B (2007) The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn²⁺ inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* 72:1535-44.
151. Maeng S, Zarate CA Jr (2007) The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Curr Psychiatry Rep.* 9:467-74.
152. Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK (2008) Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 63:349-52.
153. Maes M (1991) Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol.* 461:25-46.
154. Maes M, D'Haese PC, Scharpe S, D'Hondt (1994) Hypozincemia in depression. *J Affect Disord.* 31:135-140.
155. Maes M, De Vos N, Demedts P, Wauters A, Neels H (1999) Lower serum zinc in major depression in relation to changes in serum acute phase proteins. *J Affect Disord.* 56:189-94.
156. Maes M, Verkerk R, Vandoolaeghe E, Lin A, Scharpé S (1998) Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsiveness. *Acta Psychiatr Scand.* 97:302-8.
157. Maffei A, Prestori F, Shibuki K, Rossi P, Taglietti V, D'Angelo E (2003) NO enhances presynaptic currents during cerebellar mossy fiber-granule cell LTP. *J Neurophysiol.* 90:2478-83.

158. Maj J (2000) Farmakologia leków przeciwdepresyjnych. Neuropsychofarmakologia. Dziś i jutro. red. Bijak M, Lasoń W. Instytut Farmakologii PAN 71-100.
159. Maj J, Przegalinski E, Mogilnicka E (1984) Hypotheses concerning the mechanism of action of antidepressant drugs. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 100:1-74.
160. Maj J, Rogóż Z, Dlaboga D, Dziejicka-Wasylewska M (2000) Pharmacological effects of milnacipran, a new antidepressant, given repeatedly on the alpha1-adrenergic and serotonergic 5-HT2A systems. *J Neural Transm.* 107:1345-59.
161. Maj J.: Farmakologia leków przeciwdepresyjnych. W: Bijak M., Lasoń W. (red.) Neuropsychofarmakologia- dziś i jutro. IF PAN, Kraków 2000.
162. Malberg JE (2004) Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci.* 29:196-205.
163. Maske H (1955) Über den topchemischen Nachweis von Zink in Ammonshorn verschiedener Säugetiere. *Naturwissenschaften* 42: 424.
164. Masson J, Sagné C, Hamon M, Mestikawy E (1999) Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System. *Pharmacol Rev.* Sep 51: 439-464.
165. Matrisciano F, Scaccianoce S, Del Bianco P, Panaccione I, Canudas AM, Battaglia G, Rizzo B, Ngomba RT, Molinaro G, Tatarelli R, Melchiorri D, Nicoletti F (2005) Metabotropic glutamate receptors and neuroadaptation to antidepressants: imipramine-induced down-regulation of α -adrenergic receptors in mice treated with metabotropic glutamate 2/3 receptor ligands. *J Neurochem.* 93:1345-52.
166. Matrisciano F, Storto M, Ngomba RT, Cappuccio I, Caricasole A, Scaccianoce S, Rizzo B, Melchiorri D, Nicoletti F (2002) Imipramine treatment up-regulates the expression and function of mGluR2/3 metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 42:1008-15.
167. Mayer ML, Armstrong N (2004) Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol.* 66:161-81.
168. McDonald AJ, Alexander J, Mascagni F, Muller JF (2004) Immunocytochemical localization of GABA(B)R1 receptor subunits in the basolateral amygdala. *Brain Res.* 1018:147-58.

169. McLoughlin IJ, Hodge SJ (1990) Zinc in depressive disorder. *Acta Psychiatr Scand.* 82:451-453.
170. McMahon RJ, Cousins RJ (1998) Mammalian zinc transporters. *J. Nutr.* 128: 667–70.
171. Meinild AK, Sitte HH, Gether U (2004) Zinc potentiates an uncoupled anion conductance associated with the dopamine transporter. *J Biol Chem.* 279:49671-9.
172. Menkes DB, Aghajanian GK (1981) alpha 1-Adrenoceptor-mediated responses in the lateral geniculate nucleus are enhanced by chronic antidepressant treatment. *Eur J Pharmacol.* 74:27-35.
173. Menkes DB, Aghajanian GK, McCall RB (1980) Chronic antidepressant treatment enhances alpha-adrenergic and serotonergic responses in the facial nucleus. *Life Sci.* 27:45-55.
174. Merali Z, Du L, Hrdina P, et al. (2004) Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci* 24:1478-85.
175. Meyer JH, Ginovart N, Boovariwala A et al. (2006) Elevated monoamine oxidase A levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:1209-16.
176. Mitrovic AD, Plesko F, Vandenberg RJ (2001) Zn(2+) inhibits the anion conductance of the glutamate transporter EEAT4. *J Biol Chem.* 276:26071-6.
177. Mittal CK, Harrell WB, Mehta CS (1995) Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase. *Mol Cell Biochem.* 149-150:263-5.
178. Mott DD, Benveniste M, Dingledine RJ (2008). pH-dependent inhibition of kainate receptors by zinc. *J. Neurosci.* 28:1659–71.
179. Müller N, Schwarz MJ, Dehning S, et al. (2006) The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry* 11:680-4.
180. Nakashima AS, Dyck RH (2009) Zinc and cortical plasticity. *Brain Res. Rev.* 59:347-73.
181. Nalepa I, Vetulani J (1996) Modulation of electroconvulsive treatment induced beta-adrenergic down- regulation by previous chronic imipramine administration: the involvement of protein kinase C. *Pol J Pharmacol.* 48:489-94.

182. Nalepa I, Vetulani J (1993) Enhancement of responsiveness of cortical adrenergic receptors by chronic administration of the 5-hydroxytryptamine uptake inhibitor citalopram. *J. Neurochem.* 60: 2029-35.
183. Neliat G, Bodinier MC, Panconi E, Briley M (1996) Lack of effect of repeated administration of milnacipran, a double noradrenaline and serotonin reuptake inhibitor, on the beta-adrenoceptor-linked adenylate cyclase system in the rat cerebral cortex. *Neuropharmacol.* 35:589-93.
184. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron.* 34:13-25.
185. 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.* 53:1644-7.
186. Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci.* 16:2365-72.
187. Norregaard L, Frederiksen D, Nielsen EO, Gether U (1998) Delineation of an endogenous zinc-binding site in the human dopamine transporter. *EMBO J* 17:4266-73.
188. Nowak G (1997) Współczesne poglądy na mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych. Wykłady Monograficzne 37. Instytut Farmakologii PAN, Kraków.
189. Nowak G (2001) Does interaction between zinc and glutamate system play a significant role in the mechanism of antidepressant action? *Acta Pol. Pharm.* 58:73-75.
190. Nowak G (2000a) Transmisja glutamatergiczna w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych i patofizjologii depresji. *Metodyka przedklinicznych badań nad depresją i lekami przeciwdepresyjnymi.* Pilc A, Popik P. (red.) Pobudzające aminokwasy 2000-Aspekty związane z fizjologią oraz patologią i terapią schorzeń neuropsychiatrycznych. XVII Szkoła Zimowa IF PAN, Kraków, Przegorzały 2000: 189-197.
191. Nowak G, Żak- Knapik J (1999a) Metody radioreceptorowe- perspektywy w erze ekspansji biologii molekularnej. *Farm. Pol.* 4:190-93.

192. Nowak G, Legutko B, Skolnick P, Popik P (1998a) Adaptation of cortical NMDA receptors by chronic treatment with specific serotonin reuptake inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 342:367-70.
193. Nowak G, Legutko B, Szewczyk B, Papp M, Sanak M, Pilc A (2004) Zinc treatment induces cortical brain-derived neurotrophic factor gene expression. *Eur J Pharmacol.* 492:57-59.
194. Nowak G, Li Y, Paul IA (1996) Adaptation of cortical but not hippocampal NMDA receptors after chronic citalopram treatment. *Eur J Pharmacol.* 295:75-85.
195. Nowak G, Ordway GA, Paul IA (1995) Alterations in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex in the frontal cortex of suicide victims. *Brain Res.* 675:157-64.
196. Nowak G, Ossowska G, Jopek R, Papp M (1998b) Strychnine-insensitive glycine/NMDA sites are altered in two stress models of depression. *Pol J Pharmacol.* 50:365-9.
197. Nowak G, Pilc A (2000b) Wszystkie drogi prowadzą do NMDA- czyli mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych w świetle najnowszych badań. *Farmacja Polska* 56:163-7.
198. Nowak G, Przegalinski E (1988) Effect of repeated treatment with antidepressant drugs and elektroconvulsive shock (ECS) on [3H]-prazosin binding to different rat brain structures. *J. Neural Transm.* 71:57-64.
199. Nowak G, Schlegel-Zawadzka M (1999b) Alterations in serum and brain trace element levels after antidepressant treatment: part I. Zinc. *Biol Trace Elem Res.* 67: 85-92.
200. Nowak G, Siwek M, Dudek D, Zieba A, Pilc A (2003a) Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study. *Pol J Pharmacol.* 55:1143-7.
201. Nowak G, Szewczyk B, Sadlik K, Piekoszewski W, Trela F, Florek E, Pilc A (2003b) Reduced potency of zinc to interact with NMDA receptors in hippocampal tissue of suicide victims. *Pol J Pharmacol.* 55:455-459.
202. Nowak G, Szewczyk B, Wieronska JM, Branski P, Palucha A, Pilc A, Sadlik K, Piekoszewski W (2003c) 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.

203. Nowak G, Trullas R, Layer RT, Skolnick P, Paul IA (1993) Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 265:1380-6.
204. Nowak G, Zięba A, Dudek D, Krośniak M, Szymaczek M, Schlegel-Zawadzka M (1999c) Serum trace elements in animal models and human depression. Part I. Zinc. *Hum Psychopharmacol Clin Exp.* 14:83-86.
205. O'Leary OF, Bechtholt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I (2007) Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioural response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacol* 192:357–71.
206. Ossowska G, Klenk-Majewska B, Szymczyk G (1997) The effect of NMDA antagonists on footshock-induced fighting behavior in chronically stressed rats. *J Physiol Pharmacol.* 48:127-35.
207. Ossowska G, Zebrowska-Lupina I, Danilczuk Z, Klenk-Majewska B (2002) Repeated treatment with selective serotonin reuptake inhibitors but not anxiolytics prevents the stress-induced deficit of fighting behavior. *Pol J Pharmacol.* 54:373-80.
208. Oswald I, Brezinova V, Dunleavy DL (1972) On the slowness of action of tricyclic antidepressant drugs. *Br J Psychiatry.* 120:673-7.
209. Padovan CM, Guimarães FS (2004) Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 77:15-9.
210. Palmiter RD, Cole TB, Quaife C. F., Findley S. D (1996) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *PNAS* 93:14934-14939.
211. Palmiter RD, Findley SD (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14:639-49.
212. Pałucha A, Barański P, Szewczyk B, Pierońska JM, Kłak K, Pilc A (2005) Potential antidepressant-like effect of MTEP, a potent and highly selective nGluR5 antagonist. *Pharmacol Biochem Behav.* 81:901-6.
213. Pałucha A, Nowak G, Pilc A (2005) Perspektywy badań nad lekami przeciwdepresyjnymi. Nowakowska E. (red.) *Postępy farmakoterapii- nowe leki przeciwdepresyjne.* Poznań.

214. Pałucha A, Pilc A (2001) Układ glutaminianergiczny- interakcja z cynkiem. Nowak G. (red.) Cynk w fizjologii, patofizjologii i terapii depresji. Kraków 39-55.
215. Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Pandey SC, Pesold C, Roberts RC, Conley RR, Tamminga CA (2002) Higher expression of serotonin 5-HT(2A) receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *Am J Psychiatry*. 159:419-29.
216. Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci*. 17:5711-25.
217. Papp M, Moryl E, Willner P (1996) Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol* 263:1-7.
218. Paul IA, Layer RT, Skolnick P, Nowak G (1993) Adaptation of the NMDA receptor in rat cortex following chronic electroconvulsive shock or imipramine. *Eur J Pharmacol*. 247:305-11.
219. Paul IA, Skolnick P (2003) Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 250-272.
220. Pérez-Clausell J, Danscher G (1986) Release of zinc sulphide accumulations into synaptic clefts after in vivo injection of sodium sulphide. *Brain Res*. 362:358-61.
221. 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*. 28:631-37.
222. Peters S, Koh J, Choi DW (1987) Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science* 236:589-93.
223. Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 177:245-55.
224. Pilc A, Bijak M, Nowak G (2000) Perspektywy badań nad lekami przeciwdepresyjnymi. *Neuropsychofarmakologia. Dziś i jutro*. red. Bijak M, Lason W. Instytut Farmakologii PAN, Kraków 123-47.
225. Pilc A, Chaki S, Nowak G, Witkin JM (2008) Mood disorders: regulation by metabotropic glutamate receptors. *Biochem Pharmacol* 75: 997-1006.

226. Pilc A, Kłodzińska A, Barański P, Nowak G, Pałucha A, Szewczyk B (2002) Multiple MPEP administrations evoke anxiolytic- and antidepressant- like effects in rats. *Neuropharmacol.* 43:181-7.
227. Pilc A, Nowak G (2005) GABAergic hypotheses of anxiety and depression: focus on GABAB receptors. *Drugs of Today* 41:755-66.
228. Pilc A, Vetulani J (1982) Attenuation by chronic imipramine treatment of [3H] clonidine to cortical membranes and of clonidine- induced hypotermia: the influence of central chemosympathectomy. *Brain Res.* 238:499-504.
229. Pin JP, Duvoisin R (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 34:1-26.
230. Pitchot W, Hansenne M, Pinto E, Reggers J, Fuchs S, Ansseau M (2005) 5-Hydroxytryptamine 1A receptors, major depression, and suicidal behavior. *Biol Psychiatry* 58:854-8.
231. Pittenger C, Sanacora G, Krystal JH (2007) The NMDA receptor as a therapeutic target in major depressive disorder. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 6:101-15.
232. Płaźnik A (1994) Aminokwasy pobudzające- rola w patogenezie chorób ośrodkowego układu nerwowego. Kostowski W, Pużyński S (1996) *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna.* PZWL Warszawa: 103-112.
233. Poleszak E, Szewczyk B, Właż A, Fidecka S, Właż P, Pilc A, Nowak G (2008) D-serine, a selective glycine/ N- methyl-D- aspartate receptor agonist, antagonizes the antidepressant- like effects of magnesium and zinc in mice. *Pharm. Rep.* 60:996-1000.
234. Pomierny– Chamióło L (2008) Badanie wybranych zmian adaptacyjnych wywołanych antagonistami metabotropowych receptorów glutamatergicznych grupy I. Rozprawa doktorska.
235. Popik P (1996). *Metodyka przedklinicznych badań nad depresją i lekami przeciwdepresyjnymi. Depresja i leki przeciwdepresyjne – 10 lat później.* Przewłocka B (red.), XIII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN 27-44.
236. Popik P, Wróbel M, Nowak G (2000) Chronic treatment with antidepressants affects glycine/NMDA receptor function: behavioral evidence. *Neuropharmacology* 39:2278-87.
237. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 47:379-91.

238. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 229:327-36.
239. Porsolt RD, Brossard G, Hautbois C, Roux S (2001) Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci.* 8:8.10A.
240. Prasad AS (1993) *Biochemistry of zinc.* New York/London: Plenum Press 11:149-164.
241. Prast H, Philippu A (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 64:51-68.
242. Preskorn SH, Baker B, Kolluri S, Menniti FS, Krams M, Landen JW (2009) 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.
243. Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB (2004) Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem.* 279:14307-14.
244. Rang HP, Dale MM, Ritter JM (1999) *Farmakologia kliniczna.* Przekład: Wielosz M. (red.) Lublin 2001: 464-75.
245. Rassendren FA, Lory P, Pin JP, Nargeot J (1990) Zinc has opposite effects on NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 4:733-40.
246. Richfield EK (1993) Zinc modulation of drug binding, cocaine affinity states, and dopamine uptake on the dopamine uptake complex. *Mol Pharmacol.* 43:100-8.
247. Rogóż Z, Kolasiewicz W (2001) Effect of repeated treatment with reboxetine on the central alpha1-adrenergic system. *Pol J Pharmacol.* 53:663-7.
248. Rogóż Z, Wróbel A, Dlaboga D, Dziejzicka-Wasylewska M (2002) Effect of repeated treatment with mirtazapine on the central dopaminergic D2/D3 receptors. *Pol J Pharmacol.* 54:381-9.
249. Roman A (2007) Neurobiologiczne efekty EW- mechanizmy leczniczego działania w depresji. Hese RT, Zyss T (red.) *Leczenie elektrowstrząsami w praktyce klinicznej.* Elsevier Urban & Partner, Wrocław 24-53.
250. Roose SP, Glassman AH, Walsh BT, Woodring S (1986) Tricyclic nonresponders: phenomenology and treatment. *Am. J. Psychiatry* 143: 345–848.

251. Rosa AO, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL (2003) Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res.* 144:87-93.
252. Ruhé HG, Mason NS, Schene AH et al. (2007) Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry* 12:331-59.
253. Russo-Neustadt AA, Alexandre H, Garcia C, Ivy AS, Chen MJ (2004) Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine, citalopram, and physical exercise. *Neuropsychopharmacology* 29:2189-99.
254. Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Krystal JH (2002) Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am. J. Psychiatry* 159:663-65.
255. Sandstead HH, Frederickson CJ, Penland JG (2000) History of zinc as related to brain function *J. Nutr.* 130:496-502.
256. Sapolsky RM (2000) The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry.* 48:755-65.
257. Savaş HA, Herken H, Yürekli M, Uz E, Tutkun H, Zoroğlu SS, Ozen ME, Cengiz B, Akyol O (2002) Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder. *Neuropsychobiology.* 45:57-61.
258. Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-22.
259. Schlegel-Zawadzka M (2001) Cynk: źródła, biodostępność, metabolizm, preparaty cynku. Nowak G (red.). *Cynk w fizjologii oraz patofizjologii i terapii depresji.* Kraków, Instytut Farmakologii. Polska Akademia Nauk: 7-26.
260. Schlegel-Zawadzka M, Zięba A, Dudek D, Szymaczek M, Krośniak M, Nowak G (2000) Effect of depression and of antidepressant therapy on serum zinc levels. W: Roussel A M, Anderson R A, Favrier A E (red.). *Trace Elements in Man and Animals* 10. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers: 607-610.
261. Schmidt HD, Duman RS (2007) The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol.* 18:391-418.

262. Scholze P, Norregaard L, Singer EA, Freissmuth M, Gether U, Sitte HH (2002) The role of zinc ions in reverse transport mediated by monoamine transporters. *J Biol Chem.* 277:21505-13.
263. Sheline G, Chaikoff I, Jones H, Montgomery M (1943) Studies on the metabolism of zinc with the aid of its radioactive isotope. *J. Biol. Chem.* 149:139–151.
264. Sheline YI (2004) Następstwa depresji w hipokampie oraz w innych obszarach mózgu. Olie JP, Costa e Silva JP, Macher JP (red.). *Neuroplastyczność. Patofizjologia depresji w nowym ujęciu.* Gdańsk: Via Medica 33-46.
265. Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH (1999) Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci.* 19:5034-43.
266. Shen Y, Yang XL (1999) Zinc modulation of AMPA receptors may be relevant to splice variants in carp retina. *Neurosci Lett.* 259:177-80.
267. Shimon H, Agam G, Belmaker RH, Hyde TM, Kleinman JE (1997) Reduced frontal cortex inositol levels in *postmortem* brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 154: 1148-50.
268. Sindreu CB, Varoqui H, Erickson JD, Pérez-Clausell J (2003) Boutons containing vesicular zinc define a subpopulation of synapses with low AMPAR content in rat hippocampus. *Cereb Cortex.* 13:823-9.
269. Siwek M, Wróbel A, Dudek D, Nowak G (2005) Rola receptora NMDA oraz układu glutaminianergicznego glutaminianergicznego patofizjologii i terapii depresji. *Lęk i depresja* 4:251-65.
270. Siwek M, Dudek D, Paul IA, Sowa-Kućma M, Zięba A, Popik P, Pilc A, Nowak G (2009) Zinc supplementation augments efficacy of imipramine in treatment resistant patients: A double blind, placebo-controlled study. *J Affect Disord.* 2009 Mar 9 (Epub).
271. Skolnick P (1999) Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol.* 375:31-40.
272. Skolnick P (2002) Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. *Amino Acids* 23:153-159.
273. Skolnick P (2008) AMPA receptors: a target for novel antidepressants? *Biol Psychiatry* 63:347-8.

274. Skolnick P, Legutko B, Li X, Bymaster FP (2001) Current perspectives on the development of non-biogenic amine-based antidepressants. *Pharmacol Res.* 43:411-23.
275. 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.
276. Smart TG, Xie X, Krishek BJ (1994) Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog Neurobiol.* 42:393-41.
277. Song C, Leonard BE (2005) The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 29:627-647.
278. Souery D, Amsterdam J, de Montigny C, Lecrubier Y, Montgomery S, Lipp O, Racagni G, Zohar, J, Mendlewicz J (1999) Treatment resistant depression: methodological overview and operational criteria. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9: 83–91.
279. 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.* 115:1621–28.
280. Spiridon M, Kamm D, Billups B, Mobbs P, Attwell D (1998) Modulation by zinc of the glutamate transporters in glial cells and cones isolated from the tiger salamander retina. *J Physiol.* 506:363-76.
281. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 85:367-70.
282. Stone EA (1983) Problems with the current catecholamine hypothesis of antidepressant agents: speculations leading to a new hypothesis. *Behav. Brain. Sci.* 6:555-77.
283. Sulser F, Vetulani J, Mobley PL (1978) Mode of action of antidepressant drugs. *Biochem Pharmacol.* 27:257-261.
284. Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, et al. (2006) Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 311:77-80.
285. Swaminath G, Steenhuis J, Kobilka B, Lee TW (2002) Allosteric modulation of β_2 -adrenergic receptor by Zn²⁺. *Mol Pharmacol.* 61:65-72.

286. Swaminath G, Lee TW, Kobilka B (2003) Identification of allosteric binding site for Zn²⁺ on the β_2 -adrenergic receptor. *Biol Chem.* 278:352-56.
287. Szewczyk B, Kata R, Nowak G (2001) Rise in zinc affinity for the NMDA receptor evoked by chronic imipramine is species-specific. *Pol J Pharmacol.* 53:641-5.
288. Szewczyk B, Poleszak E, Sowa M, Siwek M, Dudek D, Ryszewska-Pokraśniewicz B, Radziwoń-Zaleska M, Opoka W, Czekał J, Pilc A, Nowak G (2008) Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacol Rep* (w druku).
289. Szewczyk G, Sowa M, Czupryn A, Wieronska JM, Branski P, Sadlik K, Opoka W, Piekoszewski W, Smialowska M, Skangiel-Kramska J, Pilc A, Nowak G (2006) Increase in synaptic hippocampal zinc concentration following chronic but not acute zinc treatment in rats. *Brain Res.* 1090:69-75.
290. Śmiałowska M, Szewczyk B, Barański P, Wierońska JM, Pałucha A, Bajkowska M., Pilc A (2002): Effect of chronic imipramine or electroconvulsive shock on the expression of mGluR1a and mGluR5a immunoreactivity in rat brain hippocampus. *Neuropharmacology* 42:1016-23.
291. Tafet GE, Bernardini R (2003) Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27:893-903.
292. Tafet GE, Smolovich J (2004) Psychoneuroendocrinological studies on chronic stress and depression. *Ann N Y Acad Sci.* 1032:276-8.
293. Takeda A (2000) Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 34:137-148.
294. Takeda A (2001) Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. *Biometals.* 14:343-51.
295. Takeda A, Minami A, Seki Y, Nakajima S, Oku N (2004) Release of amino acids by zinc in the hippocampus. *Brain Res Bull.* 63: 253-257.
296. Takeda A, Tamano H, Kan F, Itoh H, Oku N (2007) Anxiety-like behavior of young rats after 2- week zinc deprivation. *Behav Brain Res* 177: 1-6.
297. Tassabehji NM, Corniola RS, Alshingiti A, Levenson CW (2008) Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. *Physiol Behav.* 95:365-69.

298. Tatarczyńska E, Klodzińska A, Chojnacka-Wójcik E, Palucha A, Gasparini F, Kuhn R, Pilc A (2001) Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 132:1423-30.
299. Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang YJ, Impey S, Storm D, Duman RS (2000) cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci.* 20:4030-6.
300. Tierney JG (2007) Treatment-resistant depression: managed care considerations. *J Manag Care Pharm.* 13(6 Suppl A):S2-7.
301. Toru M, Kurumaji A, Ishimaru M (1994) Excitatory amino acids: implications for psychiatric disorders research. *Life Sci.* 55:1683-99.
302. Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol.* 185:1-10.
303. Turgeon SM, Albin RL (1992) Zinc modulates GABAB binding in rat brain. *Brain Res.* 596:30-34.
304. Vaidya VA, Siuciak JA, Du F, Duman RS (1999) Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures. *Neuroscience* 89: 157-66.
305. Valdizán EM, Gutierrez O, Pazos A (2003) Adenylate cyclase activity in postmortem brain of suicide subjects: reduced response to beta-adrenergic stimulation. *Biol Psychiatry* 54:1457-64.
306. Vallee BL, Falchuk KH (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73: 79-118.
307. Van Riezen H, Schnieden H, Wren AF (1977) Olfactory bulb ablation in the rat: behavioural changes and their reversal by antidepressant drugs. *Br J Pharmacol.* 60:521-8.
308. Vandenberg RJ, Ju P, Aubrey KR, Ryan RM, Mitrovic AD (2004) Allosteric modulation of neurotransmitter transporters at excitatory synapses. *Eur J Pharm Sci.* 23:1-11.
309. Vandenberg RJ, Mitrovic AD, Johnston GA (1998) Molecular basis for differential inhibition of glutamate transporter subtypes by zinc ions *Mol Pharmacol.* 54:189-96.
310. Vetulani J, Antkiewicz-Michaluk L, Rokosz-Pelc A, Pilc A (1984) Alpha up beta down adrenergic regulation: a possible mechanism of action of antidepressant treatments. *Pol J Pharmacol Pharm.* 36:231-48.

311. Vetulani J, Nalepa I (2000) Antidepressants: past, present and future. *Eur J Pharmacol.* 405:351-63.
312. Vetulani J, Sulser F (1975) Action of various antidepressant treatments reduces reactivity of noradrenergic cyclic AMP-generating system in limbic forebrain. *Nature* 257:495-6.
313. Vincent J (2004) *Nastrój i mózg*. Olie JP, Costa e Silva JP, Macher JP (red.). *Neuroplastyczność. Patofizjologia depresji w nowym ujęciu*. Gdańsk: Via Medica 21-30.
314. Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R (2000) The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 26:187-96.
315. Wang Z, Danscher G, Kim YK, Dahlstrom A, Mook Jo S (2002) Inhibitory zinc-enriched terminals in the mouse cerebellum: double-immunohistochemistry for zinc transporter 3 and glutamate decarboxylase. *Neurosci Lett.* 321:37-40.
316. Wang Z, Li JY, Dahlstrom A, Danscher G. (2001) Zinc- enriched GABAergic terminals in mouse spinal cord. *Brain Res.* 921:165-72.
317. Warner-Schmidt JL, Duman RS (2007) VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4647-52.
318. Wenzel HJ, Cole TB, Bom DE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1997) Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12676-81.
319. Westbrook GL, Mayer ML (1987) Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 328: 640-43.
320. Whittle N, Lubec G, Singewald N (2009) Zinc deficiency induces enhanced depression-like behaviour and altered limbic activation reversed by antidepressant treatment in mice. *Amino Acids* 36:147-58.
321. Wierońska J.M., Kłak K., Pałucha A., Branski P., Pilc A (2007) Citalopram influences mGlu7, but not mGlu4 receptors' expression in the rat brain hippocampus and cortex. *Brain Res.* 1184:88-95.
322. Wierońska JM, Szewczyk B, Brański P, Pałucha A, Pilc A (2002) Antidepressant-like effect of MPEP, a potent, selective and systemically active

- mGlu5 receptor antagonist in the olfactory bulbectomized rats. *Amino Acids*. 23:213-6.
323. Willner P (1990) Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther*. 45:425-55.
324. Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacol*. 134:319-329
325. Willner P (2005) Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. *Neuropsychobiol*. 52: 90-110.
326. Wojcik J, Dudek D, Schlegiel-Zawadzka M, Grabowska M, Marcinek A, Florek E, Piekoszewski W, Nowak RJ, Opoka W, Nowak G (2006) Antepartum/postpartum depressive symptoms and serum zinc and magnesium levels. *Pharmacol Rep*. 58: 571-576.
327. Xie X, Gerber U, Gahwiler BH, Smart TG (1993) Interaction of zinc with ionotropic and metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*. 159:46-50.
328. Xie X, Smart TG (1993) Properties of GABA- mediated synaptic potentials induced by zinc in adult rat hippocampal pyramidal neurones. *J. Physiol*. 460:503-23.
329. Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosami T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirano T (2007) Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol*. 177: 637-645.
330. Yanik M, Vural H, Tutkun H, Zoroğlu SS, Savaş HA, Herken H, Koçyiğit A, Keleş H, Akyol O (2004) The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 254:43-7.
331. Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N (2000) Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 149:41-4.
332. Zarate CA Jr, Du J, Quiroz J, Gray NA, Denicoff KD, Singh J, Charney DS, Manji HK (2003) Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. *Ann N Y Acad Sci* 1003:273-291.

333. Zarate CA Jr, 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* 63:856-64.
334. Zhang DQ, Ribelayga C, Mangel SC, McMahon DG (2002) Suppression by zinc of AMPA receptor-mediated synaptic transmission in the retina. *J Neurophysiol.* 88(3):1245-51.
335. Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM et al. (2005) Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45:11-6.
336. Zhou FM, Hablitz JJ (1993) Zinc enhances GABAergic transmission in rat neocortical neurons. *J Neurophysiol.* 70:1264-69.
337. Zirpel L, Parks TN (2001) Zinc inhibition of group I mGluR-mediated calcium homeostasis in auditory neurons. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2:180-7.
338. Zyss T (2007) Nowe fizykalne metody leczenia depresji. Hese RT, Zyss T (red.) Leczenie elektrowstrząsami w praktyce klinicznej. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 146-74.

ADRESY CYTOWANYCH STRON INTERNETOWYCH:

- 1. American Psychiatric Association. Treatment recommendations for patients with major depressive disorder 2000:
http://www.psych.org/psych_pract/treatg/pg/Depression2e.book-7.cfm.
- 2. National Institute of Mental Health, 2006:
<http://www.nimh.nih.gov/health/publications/the-numbers-count-mental-disorders-in-america.shtml#MajorDepressive>
- 3. U.S. Dept. of Health and Human Services. Mental health: a report of the surgeon general. Rockville, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Center for Mental Health Services, National Institutes of Health, National Institute of Mental Health; 2007:
http://www.surgeongeneral.gov/library/mentalhealth/chapter4/sec3_1.html.
- 4. <http://www.chrisparsons.de/Chris/ampa>

SPIS RYGIN I TABEL

SPIS RYGIN

| | |
|---|----|
| Ryc. 1. Schemat budowy receptora NMDA [z Danysz i wsp. 2004]. | 25 |
| Ryc. 2. Schemat budowy receptora AMPA [z 4]. | 29 |
| Ryc. 3. Schemat budowy receptora metabotropowego dla glutaminianu. | 31 |
| Ryc. 4. Hipoteza Skolnick'a. Wpływ LPD, antagonistów NMDA oraz cynku na kompleks receptora NMDA. INH PDE- inhibitory fosfodiesterazy. | 37 |
| Ryc. 5. Przekrój w płaszczyźnie strzałkowej przez mózg szczura po wybarwieniu autometalograficznym (złoto-brązowo-czarne plamy- barwienie metodą Timma- Danschera; niebieskie- metodą Nissla). Najintensywniej zabarwione miejsca to obszary najbardziej obfite w cynk subiculum (s) hilus of dentate gyrus (h) mossy fibers [z Frederickson 2000]. | 41 |
| Ryc. 6. Transportery istotne dla utrzymania homeostazy cynku w neuronie [z Nakashima 2009]. | 45 |
| Ryc. 7. Potencjalne działanie cynku w neuronie postsynaptycznym. Cynk w stężeniach fizjologicznych uwalniany z neuronu presynaptycznego wywiera wpływ na receptory w błonie neuronu postsynaptycznego, hamując receptory NMDA, kainianowe i GABA, oraz potencjalizując receptory AMPA. Cynk może również dyfundować do pobliskich komórek glejowych i hamować EAAT-1. Do neuronu postsynaptycznego cynk może wchodzić poprzez kanały receptorów NMDA, AMPA, napięcioczulne kanały wapniowe VDCC oraz wymiennik sodowo- cynkowy. Cynk może modulować ścieżki przekazywania sygnału (CaMKII, PKC i cAMP) bezpośrednio lub pośrednio poprzez aktywację receptora cynkowego GPR39 [z Nakashima 2009]. | 47 |
| Ryc. 8. Molekularny mechanizm działania cynku oraz wpływ BDNF na funkcje receptora NMDA [z Szewczyk i wsp. 2008, zmienione] | 52 |
| Ryc. 9. Zmiany wiązania [³ H]Prazosyny do receptorów α1 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparaginianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. Analiza testem t-studenta, *p<0,05. Liczebność w grupach N=5. | 75 |
| Ryc. 10. Zmiany wiązania [3H]Klonidyny do receptorów α2 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. Analiza testem t-studenta. Liczebność w grupach N=5. | 76 |
| Ryc. 11. Zmiany wiązania [3H] CGP 12177 do receptorów β1 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. Analiza testem t-studenta, *p<0,05. Liczebność w grupach N=5 | 77 |
| Ryc. 12. Zmiany wiązania [³ H]8OH-DPAT do receptorów serotoninerгіcznych 5-HT _{1A} w hipokampie szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c oraz imipraminy w dawce 15mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną (stężenie liganda 1nM). Zastosowano analizę wariancji (ANOVA) i test Dunnett'a. Brak znamienności. Liczebność w grupach N= 6-8. | 78 |
| Ryc. 13. Zmiany wiązania [³ H]8OH-DPAT do receptorów serotoninerгіcznych 5-HT _{1A} w hipokampie szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c oraz | |

| | |
|--|----|
| imipraminy w dawce 15mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną (stężenie liganda 5nM). Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a, *p<0,05. Liczebność w grupach N= 6-8..... | 79 |
| Ryc. 14. Zmiany wiązania [³ H] 8-OH DPAT do receptorów serotoninerгіcznych 5-HT _{1A} w hipokampie szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną. Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a. NaCl vs Zn *p<0,05. Liczebność w grupach N=3..... | 80 |
| Ryc. 15. Zmiany wiązania [³ H] Ketanseryny do receptorów serotoninerгіcznych 5-HT ₂ w korze mózgowej szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. oraz imipraminy w dawce 15mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną (stężenie liganda 0,6 nM). Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a,. Brak znamienności. Liczebność w grupach N= 6-8..... | 81 |
| Ryc. 16. Zmiany wiązania [³ H]Ketanseryny do receptorów serotoninerгіcznych 5-HT ₂ w korze mózgowej szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. oraz imipraminy w dawce 15mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną (stężenie liganda 3 nM). Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a,, *p<0,05. Liczebność w grupach N= 6-8..... | 82 |
| Ryc. 17. Zmiany wiązania [³ H]Ketanseryny do receptorów serotoninerгіcznych 5-HT ₂ w korze mózgowej szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) i testu Dunnett'a. NaCl vs Zn *p<0,05. Liczebność w grupach N=5..... | 83 |
| Ryc. 18 Wpływ wielokrotnych podań wodorooasparagianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. na gęstość receptorów mGluR5 w korze mózgowej szczura. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. Do obliczeń zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test Dunnetta. Liczebność w grupach N= 5-7. | 84 |
| Ryc. 19. Wynik dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. na wypieranie [H ³]L-689,560 przez glicynę z wiązania do receptorów NMDA w korze mózgowej szczura w środowisku buforu. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Liczebność w grupach N=4-5..... | 85 |
| Ryc. 20. Wynik dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65 mg/kg m.c. na wypieranie [H ³]L-689,560 przez glicynę z wiązania do receptorów NMDA w korze mózgowej szczura. Analiza przeprowadzona w obecności 1 mM Zn. Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) *p<0,05 vs NaCl. Liczebność w grupach N=4-5..... | 86 |
| Ryc. 21. Wyznaczanie dawki aktywnej cynku w teście Porsolta u myszy. Znamienność statystyczną wyznaczono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Bonferroni, *p<0,001 vs NaCl. Liczebność w grupach N=9-11..... | 87 |
| Ryc. 22. Wpływ podania WAY 100635 i ritanseryny na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) *p<0,001 vs NaCl; #p < 0.001 vs Zn. Liczebność w grupach N=6-13..... | 89 |
| Ryc. 23. Wpływ łącznego podania fluoksetyny w dawce 5 mg/kg m.c. i cynku w dawce 2.5 mg/kg m. c. na czas bezruchu w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem | |

*dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) *p<0,01 vs. NaCl, #p<0.001 vs Zn (Test Bonferroni).*

Liczebność w grupach N=9-10..... 90

*Ryc. 24. Wpływ podania NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Bonferroni. *p<0,05 vs NaCl. Liczebność w grupach N=8-11. 91*

*Ryc. 25. Wpływ podania L 701,324 w dawce 1mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Bonferroni. *p<0,05 vs NaCl, # p<0,05, ## p<0,01vs. Zn+Ll. Liczebność w grupach N=9-12 92*

*Ryc. 26. Wpływ podania CGP 37849 w dawce 0.3mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem i testu t-studenta. *p<0,05 vs. NaCl. Liczebność w grupach N=11. 93*

*Ryc. 27. Wpływ podania MK-801 w dawce 0.05mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Student-Newman-Keuls. *p<0,05 vs. NaCl. Liczebność w grupach N=9-10. 94*

*Ryc. 28. Wpływ podania NBQX w dawce 10 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji i testu Bonferroni. *p<0,01vs NaCl. Liczebność w grupach N=5-8. 95*

*Ryc. 29. Wpływ łącznych podań cynku w dawce 2.5mg/kg m.c. i związku CX 614 w dawce 1mg/kg m.c. na czas bezruchu zwierząt w teście wymuszonego pływania Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji i testu Bonferroni. *p<0,05 vs NaCl. Liczebność w grupach N= 8-12..... 96*

*Ryc. 30. Wpływ podań fluoksetyny w dawce 20 mg/kg m.c. (FLU 20) na parametry: bezruch, pływanie, wspinanie w FST u szczurów. Wyniki podano jako wartości średnie ± SEM. *p < 0.05, #p < 0.001 vs NaCl (test t-studenta). Liczebność w grupach n=9-10 97*

*Ryc. 31. Wpływ podań cynku w dawce 5 mg/kg m.c. (Zn 5) na parametry: bezruch, pływanie, wspinanie w FST u szczurów. Wyniki podano jako wartości średnie ± SEM, liczebność w grupach n=9-10 *p<0.05, #*p<0.05 vs NaCl (test t-studenta). 97*

*Ryc. 32. Wpływ podania NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Analiza statystyczna przeprowadzona z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Newman-Keulsa. *p<0,05 vs NaCl, #p<0,05 vs Zn. Liczebność w grupach N=8 98*

SPIS TABEL

Tab. 1. Podział LPD wg mechanizmu działania [z Maj 2000]. 11

Tab. 2. Zmiany wiązania [3H]Prazosyny do receptorów α_1 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. 76

Tab. 3. Wiązanie [³H] Klonidyny do receptorów α_2 pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparagianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. 77

| | |
|---|----|
| Tab. 4. Zmiany wiązania [³ H] CGP 12177 do receptorów β ₁ pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. | 78 |
| Tab. 5. Zmiany wiązania [³ H]8OH-DPAT do receptorów serotonergicznych 5-HT _{1A} w hipokampie szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c oraz imipraminy w dawce 15mg/kg m.c. | 79 |
| Tab. 6. Wpływ wielokrotnych podań wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. w porównaniu do kontroli na wiązanie [³ H] 8-OH DPAT do receptorów 5-HT _{1A} w korze hipokampie szczura. | 80 |
| Tab. 7. Zmiany wiązania [³ H] Ketanseryny do receptorów 5-HT ₂ w korze mózgowej szczura pod wpływem dwutygodniowego podawania wodorooasparaginianu cynku w dawce 65 mg/kg i imipraminy w dawce 15 mg/kg. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM z 5 oznaczeń na grupę. *p < 0,05 vs. grupa kontrolna (NaCl). | 82 |
| Tab. 8. Wpływ wielokrotnych podań wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. w porównaniu do kontroli na wiązanie [³ H] Ketanseryny do receptorów 5-HT ₂ w korze mózgowej szczura. | 83 |
| Tab. 9. Wpływ wielokrotnych podań wodorooasparaginianu cynku w dawce 65mg/kg m.c. na wiązanie [³ H]MPEP do receptorów mGluR5 w korze mózgowej szczura. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM | 84 |
| Tab. 10. Wpływ podania różnych dawek cynku na zachowanie myszy w teście Porsolta. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 88 |
| Tab. 11. Wpływ podania WAY 100635 (WAY) w dawce 0.3mg/kg m.c. i ritanseryny (RIT) w dawce 4 mg/kg m.c. na aktywność cynku (Zn) w teście wymuszonego pływania u myszy. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 88 |
| Tab. 12. Wpływ podania fluoksetyny w dawce 5 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 89 |
| Tab. 13. Wpływ podania NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 90 |
| Tab. 14. Wpływ podania L 701,324 w dawce 1mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 91 |
| Tab. 15. Wpływ podania CGP37849 w dawce 0.3mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 92 |
| Tab. 16. Wpływ podania MK-801 w dawce 0.05mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 93 |
| Tab. 17. Wpływ podania NBQX w dawce 10 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 94 |
| Tab. 18. Wpływ łącznych podań cynku w dawce 2.5mg/kg m.c. i związku CX 614 w dawce 1mg/kg m.c. na czas bezruchu zwierząt w teście wymuszonego pływania. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 95 |
| Tab. 19. Wpływ podania NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność cynku w teście wymuszonego pływania u szczurów. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. | 98 |
| Tab. 20. Wpływ podania cynku w dawce 5 mg/kg m.c. i WAY100635 w dawce 0,3 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). *p < 0.05 vs NaCl (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N= 6. | 99 |

| | |
|--|------------|
| <i>Tab. 21. Wpływ podania cynku w dawce 5 mg/kg m.c. i Ritanseryny (Rit) w dawce 4 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę przeprowadzono przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). *p < 0.05 vs NaCl (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N= 6.</i> | <i>100</i> |
| <i>Tab. 22. Wpływ podania cynku w dawce 5 mg/kg m.c. i NMDA w dawce 75 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). *p < 0.05 vs NaCl (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N= 6.</i> | <i>100</i> |
| <i>Tab. 23. Wpływ łącznych podań cynku w dawce 2.5 mg/kg m.c. i związków L- 701,324, MK- 801, CX 614 oraz CGP 37849 kolejno w dawkach 1, 0.05, 1 i 0.3mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu Bonferroni. Liczebność w grupach N= 8-12.</i> | <i>101</i> |
| <i>Tab. 24. Wpływ podania cynku w dawce 5 mg/kg m.c. i NBQX w dawce 10 mg/kg m.c. na aktywność lokomotoryczną myszy. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). *p < 0.05 vs NaCl (Test Bonferroni). Liczebność w grupach N= 6.</i> | <i>102</i> |