ROLE GLUTAMÁTU V NEURODEGENERATIVNÍCH ZMĚNÁCH HIPOKAMPU ZPŮSOBENÝCH STRESEM

Role of glutamate in neurodegenerative changes in the hippocampus caused by stress

12: 100–104, 2010

ISSN 1212-4117

Petr Zach^{1, 3}, Jana Mrzílková³, Karel Valeš²

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra preklinických oborů

²Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha

³Anatomický ústav 3. LF UK, Praha

Summary

The experimental use of corticoids is focused on simulation of processes commonly occurring in the organism or in the treatment with these substances. High corticoid levels exert negative effects particularly on memory structures of the CNS such as the hippocampus. High glucocorticoid levels reduce CRH levels through the feedback loop mechanism. In contrast, elevated CRH levels negatively affect the amount of glucocorticoids circulating in the blood. In a number of diseases (as for example posttraumatic stress disorder or Alzheimer disease) there are high levels of glucocorticoids. Glucocorticoids are mediators of the stress reaction (flight or fight) in agreement with the activation of sympathetic part of the autonomous nervous system. In the evolution, the system made the organism possible to escape particularly from a physical danger (for example primeval man was pursued by a tiger). This system is currently by far not adapted to the rapidly varying conditions of the life. A number of sedentary occupations do not make it possible to use it in an optimum way. It is perhaps possible that this is a reason for maladaptive patterns of the stress reaction manifested in chronic stress by diabetes, hypertension, dementia and further so called civilization diseases. One of possibilities of investigating these processes is the animal stress model in laboratory rats. Groups of animals are administered for a certain period with CRH and/or glucocorticoids and compared to controls. After completing the experiment, we search for morphological changes in the CNS (volumetric reduction in the hippocampus) or follow behavioural changes over time. The most severe damage occurs in the group administered with glucocorticoids compared with the group receiving CRH only or that administered with CRH + glucocorticoids. This investigation can be used to understand further processes occurring at cellular or subcellular level.

Key words: hippocampus – stress – glucocorticoids – CRH – behavioural – civilization diseases

Souhrn

Experimentální použití kortikoidů má za cíl simulovat procesy odehrávající se v organismu běžně nebo při léčbě těmito látkami. Vysoké hladiny kortikoidů mají negativní efekt zejména na paměťové struktury CNS, jako je hipokampus. Vysoká hladina glukokortikoidů snižuje mechanismem zpětnovazebné kličky hladinu CRH. Naopak zvýšená hladina CRH působí negativně na množství v krvi cirkulujících glukokortikoidů. Při řadě chorob (např. posttraumatická stresová porucha nebo Alzheimerova nemoc) je přítomna vysoká hladina glukokortikoidů. Glukokortikoidy jsou mediátory stresové reakce (flight or fight – uniknout nebo bojovat), v souladu s aktivací sympatetické části autonomního nervového systému. Evolučně tento systém sloužil organismu uniknout z nebezpečí především fyzického (pračlověk třeba honil tygr). V současnosti tento systém není ještě zdaleka adaptován na rychle se měnící podmínky života. Spousta sedacích zaměstnání neumožňuje jeho využití optimálním způsobem. Možná i proto vidíme maladaptivní vzorce stresové reakce, projevující se při chronickém stresu cukrovkou, vysokým krevním tlakem, demencí a dalšími tzv. civilizačními chorobami. Jednou z možností zkoumání těchto pochodů je animální model stresu u laboratorního

potkana. Skupinám zvířat je podáván po určitou dobu CRH a/nebo glukokortikoidy v porovnání s kontrolní skupinou. Po skončení experimentu hledáme morfologické změny CNS (volumetrické zmenšení hipokampu) nebo v průběhu sledujeme behaviorální změny. Největší poškození nastává u skupiny s aplikací glukokortikoidů ve srovnání se skupinou s aplikací pouze CRH nebo se skupinou s aplikací CRH i glukokortikoidů. Těchto sledování pak lze využít pro pochopení dalších proocesů odehrávajících se na buněčné nebo subcelulární úrovni.

Klíčová slova: hipokampus – stres – glukokortikoidy – CRH – behaviorální – civilizační onemocnění

ÚVOD

Naléhavě diskutovaným problémem je neurotoxicita glukokortikoidů. Animální modely ukazují, že vystavení vysokým anebo dlouhodobě působícím dávkám glukokortikoidů či intenzivnímu stresu (exo- nebo endogenní) vede ke strukturálním změnám až nekróze neuronů hipokampu. Podobně u pacientů trpících nadprodukcí kortisolu při Cushingově syndromu byla nalezena atrofie hipokampu. Také pacienti s chorobami, u kterých je vysoká hladina kortikoidů při vzniku (posttraumatická stresová porucha – PTSD) nebo ve svém průběhu (afektivní poruchy, demence Alzheimerova typu), měli ve srovnání s kontrolními skupinami statisticky významné zmenšení hipokampu a horší výsledky v testech zaměřených na krátkodobou paměť. Stres vede cestou aktivace limbického systému (Papežův okruh) a retikulární formace ke zvýšení produkce kortikoliberinu (CRH). Ten vyvolá v kůře nadledvin zvýšenou produkci kortikoidů. Vysoká hladina kortikoidů naopak mechanismem označovaným jako zpětnovazebná klička omezuje vlivem na výše uvedené struktury CNS produkci CRH. Tato zpětná vazba je zprostředkována několika typy glukokortikoidních receptorů, lokalizovaných především v hipokampu. Při snížení citlivosti glukokortikoidových receptorů dochází ke snížení potlačení produkce CRH. Nadprodukce CRH ústí v nadprodukcí ACTH a postupně i v nadprodukcí glukokortikoidů. K takovéto situaci dochází při hipokampálních lézích či při chronickém stresu. Stres pak vede mimo jiné ke snížení exprese některých neuronálních růstových faktorů (především BDNF) (Höschl, Hájek, 2001) a toho důsledkem je neodpovídající růst a rozvoj CNS (obr. 1).

METODA

Mechanismus akce kortikoidů a CRH studujeme v experimentu na laboratorním potkanovi. Sledujeme podíl kortikoidů a CRH na strukturálních změnách hipokampu a s tím související

kognitivní deficit. Zvířata jsou rozdělena do pěti skupin – 1. skupina: vysoké hladiny CRH a kortikoidů (GC) (potkani předávkovaní CRH pomocí osmotické pumpy zavedené do hipokampu); 2. skupina: vysoká hladina CRH bez zvýšení hladiny GC (adrenalektomovaní potkani předávkovaní CRH pomocí osmotické pumpy); 3. skupina: vysoká hladina GC, bez zvýšených hladin CRH (potkani předávkovaní kortikoidy pomocí osmotické pumpy); 4. skupina: kontrolní, tzn. žádná aplikace CRH ani GC; 5. skupina: adrenalektomovaní potkani se substitucí GC na normální hladinu.

Tento nově vyvinutý pokusný model umožňuje studovat roli jednotlivých komponent neurochemické kaskády zúčastněných neurodegenerativních procesů. To vše izolovaně od vlivu procesů ostatních. Také jimi vyvolané strukturální změny lze korelovat se změnami v chování, především s poruchami paměti. Časově jsou experimenty rozčleněny do tří etap. V první etapě jsou zvířata testována v baterii behaviorálních testů. Poté jsou rozdělena do experimentálních skupin a po dobu 3 týdnů podrobena farmakologickým manipulacím (aplikaci CRH anebo GC). V druhé části této etapy pak opět probíhá behaviorální testování. Po ukončení druhé etapy následuje poslední čtyřtýdenní etapa, ve které již nejsou zvířata vystavena působení GC resp. CRH (fáze odpočinku). V tomto období dozívají strukturální a s tím související kognitivní změny nastartované v druhé etapě. I v této etapě zvířata projdou baterií kognitivních testů. Takovéto časové schéma umožňuje sledovat dynamiku behaviorálních změn v různých fázích vlivu studovaných látek. Po skončení experimentu jsou mozky zvířat připraveny pro volumetrické a histochemické zkoumání strukturálních změn hipokampu korespondujících s kognitivním deficitem. Ve všech etapách je zvířatům odebírána krev a trus pro stanovování kontrolních hladin ACTH a GC.

Zdroj: časopis American Massage Therapy Association (AMTA), 2000, vol. 30, no 1, s. 42, ilustrace Bev Ransom

Obr. 1 Stres a jeho vliv na HPA (hypothalamo-hypofyzeo-adrenální) osu

Vysvětlivky: CRH – kortikoliberin, ACTH – adrenokortikotropní hormon

VÝSLEDKY

U zvířat skupiny č. 1 s aplikací vysokých hladin CRH i GC behaviorální testy ukazují zhoršení paměti a kognitivních funkcí, ale méně výrazně než u skupiny č. 3, kde bylo pozorováno nejvyšší narušení. Morfologické změny také nejsou tak výrazné jako v případě skupiny č. 3. Nejmenší změny jak behaviorální tak morfologické byly pozorovány u skupiny č. 2 (aplikace pouze CRH), kde nedocházelo kvůli adrenalectomii k výlevu kortikoidů do krevního oběhu. Nejvý-

raznější změny na hipokampu podobně jako nejvýraznější behaviorální změny byly pozorovány u skupiny č. 3 (aplikace kortikoidů). V porovnání s kontrolními zvířaty (skupiny č. 4) byla pozorována změna volumetrické laterality (větší objem levého hipokampu u skupiny č. 3 v porovnání s větším objemem hipokampu vpravo u skupiny č. 4). Největší změny (jak behaviorální, tak morfologické) tedy byly pozorovány u skupiny č. 3 (skupiny s aplikací GC).

DISKUSE

Výsledky dokládají kvalitativně i kvantitativně rozdílné poškození kognitivních funkcí u jednotlivých experimentálních skupin. To poukazuje na klíčovou roli GC v neuroplastických i neurodegenerativních změnách v hipokampu. Nabízí se tedy možnost studovat přesnou roli GC a zejména vztah GC a následné kaskády neurobiologických procesů, především excitotoxickou roli glutamátu, stejně jako vztah mezi změnami v chování na jedné straně a volumetrií a histochemickými změnami na straně druhé.

Preklinické studie ukazují, že časné trauma mění senzitivitu hypothalamo-hypofyzeo-adrenální osy (HPA) především změnami v expresi genů pro CRH receptory, glukokortikoidní receptory a centrální benzodiazepinové receptory. Toto otevírá potenciální terapeutické možnosti ovlivňování činnosti CRH receptorů a glukokortikoidních receptorů. Účinnost anti-glukokortikoidních látek nelze vysvětlit pouhým snížením hladiny GC, neboť to by vedlo k indukci výlevu CRH a tím ke zhoršení anxiety a deprese, což nepozorujeme (Höschl, Hájek, 2001). Bylo prokázáno, že zvýšená hladina kortikoidů ovlivňuje procesy učení (Bodnoff et al., 1995). Stresující události také narušují dlouhodobou potenciaci v hipokampu (Shors et al., 1997), struktury klíčové pro prostorovou paměť (Hölscher, 1999).

Preklinické a klinické studie ukazují, že stres a deprese vedou k redukci celkového objemu, atrofii a ztrátě neuronů v dospělém hipokampu. Je dobře zdokumentováno, že vystavování novorozenečným potkanům novým podnětům vede ke změně hipokampální volumetrické asymetrie (Verstynen et al., 2001). Také opakovaný stres vytváří změny plasticity mozku v animálním modelu. Vliv těchto změn na změny chování ve vztahu ke specifickým mozkovým oblastem je ještě stále předmětem diskusí. Kupříkladu, granulózní buňky z gyrus dentatus jsou významně poškozeny během poklesu neurogeneze u potkana po dlouhodobém stresu (Radley, Morrison, 2005). Chronická antidepressivní léčba ale posiluje neurogenezu v hipokampu u potkana a mohla by tudíž zastavit nebo zvrátit atrofii a lézi způsobenou stresem i u člověka. Nedávné studie ukazují, že neurogeneze je nezbytná z hlediska účinku antidepressiv v behaviorálních modelech deprese (Warner-Schmidt, Duman, 2006).

ZÁVĚR

Hipokampus je značně postižen GC i stresem, což mění jeho následný vliv na HPA osu. Chronické podávání GC – uměle vyvolané vysoké hladiny – vede k retrakci apikálních dendritů a debranchingu (20 %) v CA3c pyramidálních neuronech (Watanabe et al., 1992). Opakovaný stres má podobný účinek na dendritickou přestavbu v oblasti CA3 hipokampu jako GC. Jednou z charakteristik dlouhotrvajícího stresu je změna počtu dendritických výběžků a obecně morfologie hipokampu, mediální prefrontální kůry a zřejmě řady dalších oblastí CNS. Takovéto strukturální synaptické změny mohou být kompenzací ke glutamátům nebo kalcium vyvolané neurotoxicitě během delších období stresu. Jelikož opakovaný stres také podněcuje apikální dendritickou retrakci v oblasti CA3 hipokampu, může to mít vliv na celou synaptickou populaci. GC ovlivňují řadu neuropřenašecových systémů. Potencují výlev a inhibují zpětné vychytávání glutamátu, zvyšují expresi NMDA receptoru. Snižují expresi neurotrofních faktorů (Smith et al., 1995) a aktivitu GABAergního systému (McEwen et al., 1997). Glutamátem zprostředkovaná aktivita NMDA receptoru za současného snížení GABAergní inhibice vede k příjmu vápníku neurony, což vyúsťuje k depolymerizaci cytoskeletálních proteinů, autolýze a eventuálně k neuronální smrti (Höschl, Hájek, 2001). Chronický stres je také doprovázen změnami ve struktuře cytoskeletu. Alfa tubulin (hlavní izoforma mikrotubulů v neuronálním cytoskeletu) může být post-translačně modifikován ve vysoce dynamickou tyrosinovanou formu (Gundersen et al., 1987) nebo stabilní acetylovanou formu (Contin, Arce, 2000). Chronický stres vede v hipokampu ke zvýšení výskytu acetylovaného tubulinu a snížení tyrosinované formy. Zdá se, že tyto cytoskeletální změny jsou klíčem k normální adaptivní odpovědi tkáně (Bianchi et al., 2003). Extrémní stres nebo podání kortikoidů vede k vzestupu tau fosforylace a proteolýze spectrinu (Okawa et al., 2003). Tyto glutamátem a následným vtokem vápníku indukované změny buněčných proteinů mohou být potenciálním terčem neuroprotektivních agens. Na klíčovou roli výlevu glutamátu ukazuje i fakt, že phenytoin, látka interferující s výlevem excitálních aminokyselin, zabraňuje stresem indukované atrofii hipokampálních neuronů (Watanabe et al., 1992). Stresem indukovanou atrofii hipo-

kampálních neuronů není možno blokovat pomocí selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Naproti tomu tianepin, látka, jejíž antidepresivní účinek není uspokojivě objasněn, moduluje v hipokampu činnost NM-DA receptorů (Kole et al., 2002). Podobně některé studie ukazují na antidepresivní vliv NM-DA antagonistů (Berman et al., 2000).

Všechny tyto jevy odehrávající se na buněčné nebo subcelulární úrovni je možno studovat na modelu experimentálně zvýšených hladin CRH anebo GC u laboratorního potkana.

* *Práce byla podpořena z grantu IGA 9180-3*

LITERATURA

BERMAN, R. M. et al.: Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. In: *Biological Psychiatry*, 2000, vol. 15, no 47, s. 351–354.

BIANCHI, M., HEIDBREDE, C., CRESPI, F.: Cytoskeletal changes in the hippocampus following restraint stress: role of serotonin and microtubules. In: *Synapse*, 2003, vol. 1, no 49, s. 188–194.

BODNOFF, S. R. et al.: Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. In: *Journal of Neuroscience*, 1995, vol. 15, s. 61–69.

CONTIN, M. A., ARCE, C. A.: Tubulin carboxypeptidase/microtubules association can be detected in the distal region of neuronal processes. In: *Neurochemical Research*, 2000, vol. 25, s. 27–36.

GUNDERSEN, G. G., KHAWAJA, S., BULINSKI, J. C.: Postpolymerization deetyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. In: *Journal of Cell Biology*, 1987, vol. 105, s. 251–264.

HÖLSCHER, C.: Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. In: *Behavioural Brain Research*, 1999, vol. 100, s. 225–235.

HÖSCHL, C., HÁJEK, T.: Hippocampal damage mediated by corticosteroids a neuropsychiatric research challenge. 2001. In: *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 2001, vol. 251, Suppl. 2, s. 81–88.

KOLE, M. H., SWAN, L., FUCHS, E.: The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational. In: *European Journal of Neuroscience*, 2002, vol. 16, s. 807–816.

McEWEN, B. S., CONRAD, C.D., KURODA, Y., FRANKFURT, M., MAGARINOS, A. M., MCKITTRICK, C.: Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. In: *European Neuropsychopharmacology*, 1997, vol. 7, s. S323–S328.

OKAWA, Y., ISHIGURO, K., FUJITA, S. C.: Stress-induced hyperphosphorylation of tau in the mouse brain. In: *FEBS Letters*, 2003, vol. 30, no 535, s. 183–189.

RADLEY, J. J., MORRISON, J. H.: Repeated stress and structural plasticity in the brain. In: *Ageing Research Review*, 2005, vol. 4, s. 271–287.

SHORS, T. J., GALLEGOS, R. A., BREINDL, A.: Transient and persistent consequences of acute stress on long-term potentiation (LTP), synaptic efficacy, theta rhythms and bursts in area CA1 of the hippocampus. In: *Synapse*, 1997, vol. 26, s. 209–217.

SMITH, M. A., MAKINO, S., KVETNANSKY, R., POST, R.M.: Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. In: *Journal of Neuroscience*, 1995, no 15, s. 1768–1777.

VERSTYNEN, T., TIERNEY, R., URBANSKI, T., TANG, A.: Neonatal novelty exposure modulates hippocampal volumetric asymmetry in the rat. In: *Neuroreport*, 2001, vol. 12, s. 3019–3022.

WARNER-SCHMIDT, J. L., DUMAN, R. S.: Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. In: *Hippocampus*, 2006, vol. 16, s. 239–249.

WATANABE, Y., GOULD, E., CAMERON, H. A., DANIELS, D. C., McEWEN, B. S.: Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. In: *Hippocampus*, 1992, vol. 2, s. 431–435.

Petr Zach et al.
zach.petr@post.cz