VÝZKUMNÝ ZÁMĚR 2 - ČASNÉ ZMĚNY GLUTAMÁTERGNÍHO SYSTÉMU JAKO PŘÍČINNY VZNIKU FUNKČNÍCH ZMĚN CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU

Výzkumný cíl 2 : Studium přirozeně se vyskytujících modulátorů glutamátergní neurostrnasmise

Aktivita 1 – Studie kynureninové metabolické dráhy: sdílená cesta patofyziologie afektivní a psychotické poruchy

Cílem je prozkoumat úlohu perinatální a dospělé imunitní stimulace v aktivaci kynurenické dráhy (KP) pro metabolom mozku biochemickou analýzou obsahu mozku a behaviorální studie v animálních modelech. Cytokiny podporují proteinovou syntézu KP enzymů a formování kyseliny kynureninové (KYNA) a chinolinové (QUIN). Předpokládáme, že psychiatrické poruchy, konkrétně bipolární porucha a schizofrenie, sdílí společnou patofyziologii na základě imunitní dysregulace vedoucí k alternaci v KP metabolismech.

Konkrétní kroky:

- kynureninové metabolity odlišně ovlivňují glutamátergní transmisi, kdy KYNA inhibuje, zatímco QIUN potencuje NMDAR funkci. Tato protichůdná modulace receptorů NMDA by měla být identifikovatelná v behaviorálních testech. Proto chceme posoudit, jak aktivace imunitního systému působí na různé domény chování, o nichž víme, že odráží změněnou funkci NMDAR.
- Prozkoumat úlohu perinatální a dospělé imunitní stimulace v aktivaci kynurenické dráhy biochemickou analýzou obsahu mozku. Lipopolysacharid (endotoxin LPS), nejhojnější komponent Gram-negativních stěn bakteriálních buněk, stimuluje uvolnění cytokinů, čímž napodobuje bakeriální infekci. Cytokiny podporují proteinovou syntézu enzymů kynureninové dráhy a tvorbu KYNA a QUIN.
- prozkoumat efekt „druhého zásahu“ již vyvinutého fenotypu podobného schizofrenii nebo depresi, vyvolaného imunitní stimulací. Jsme přesvědčeni, že předchozí imunitní aktivace povede ke zvýšené zranitelnosti vůči následné nepříznivé události („druhý zásah“). Zhodnotíme efekt podání NMDAR antagonisty (MK-801) dospělým potkanům po perinatálním podání LPS. Podobně budeme zkoumat imunitní změny po odstranění bulbů (čichová bulbektomie, OBX) a efekt systémového akutního podání LPS zvířatům s OBX. OBX je animální model depresivní poruchy, která vede k fenotypu podobnému depresi s dlouhodobými prozánětlivými účinky
- určit, zda behaviorální a biochemická reakce na LPS a reaktivita vůči NMDA antagonistům má cirkadiánní složku a mohla by být ovlivněna chronofarmakologickou intervencí
- prozkoumat, zda by hladiny cytokinů, biochemických markerů a behaviorální změny mohly být zlepšeny podáním imunomodulačním melatoninem

Kynureninové dráze je věnována rostoucí pozornost poté, co se její souvislost se zánětem, imunitní reakcí a neurologickými potížemi stala více zřejmou. Kynureninová dráha představuje alternativní metabolickou dráhu tryptofanového katabolismu (Richard et al., 2009) k jinak dobře známé dráze vedoucí k syntéze serotoninu a melatoninu. Tryptofan může být metabolizován v gliálních buňkách enzymy indoleaminu 2,3-dioxygenázy (IDO) nebo tryptofanu 2,3-dioxygenázy (TDO) za vzniku kynureninu (KYN) (Davis a Liu, 2015). TDO je zodpovědný za oxidační degradaci tryptofanu za normálních fyziologických podmínek, zatímco IDO je aktivován stimulovaným imunitním systémem (Larkin et al., 2016). IDO není konstitučně vyjádřený a exprese je tedy vyvolána pouze po aktivaci jeho transkripčních faktorů. Signální dráhy

proti proudu těchto transkripčních faktorů se účastní na regulaci aktivity IDO. Stimulace TLR3 a TLR4 receptorů vede k expresi prozánětlivých cytokinů, což vede k transkripci a převodu IDO proteinu (Mbongue et al., 2015). Klinicky relevantním důsledkem jeho up-regulace je nedostatek volného tryptofanu pro syntézu neurotransmiteru serotoninu a jeho metabolitu melatoninu.

Kyselina kynureninová je syntetizována z KYN kynurenin aminotransferázou (KAT) především v astrocytech, zatímco syntéza kyseliny chinolinové (QUIN) z kynureninu je katalyzována kynurenin monoxygenázou (KMO) v mikrogliích, monocytech nebo makrofázích. Tyto látky jsou endogenní modulátory NMDA glutamátových receptorů, zatímco KYNA působí jako antagonista NMDA receptoru na místě glycinu a QUIN jako agonista NMDA receptoru (Davis a Liu, 2015). Astrocyty syntetizují kyselinu kynureninovou (KYNA), protože postrádají enzym KMO (Guillemin et al., 2001). Působením na glutamátergní neurotransmisi tyto neuroaktivní metabolity hrají klíčovou roli ve vývoji chování podobného depresi a schizofrenii. Skutečně bylo zjištěno, že hladiny KYN a KYNA byly zvýšené v CSF, v prefrotnální kůře a předním gyru cinguli pacientů se schizofrenií. Inhibice NMDA receptorů kyselinou KYNA může negativně ovlivnit glutamátergní transmisi vedoucí k projevu schizofrenických symptomů. Dysregulace KP je rovněž doložena u depresivních pacientů, avšak na rozdíl od schizofrenie je zde zvýšená hladina kyseliny chinolinové (QUIN; syntetizovaná z KYN).

Imunitní systém je aktivován u obou onemocnění a up-regulace enzymů kynureninové dráhy by tak mohl být identifikován u schizofrenie i deprese. Divergentní efekt imunitní aktivace na kynureninový metabolismus závisí na typově specifickém cytokinu, spojeným buď se schizofrenií nebo depresí. Zvýšené prozánětlivé cytokiny typu 1 byly nalezeny u závažné deprese, zatímco schizofrenie je charakterizována nerovnováhou mezi cytokiny typu 1 a typu 2 (Schwarz et al., 2001). Th2 dominantní imunitní odpověď (posun Th2) zjištěná v subpopulaci schizofrenních pacientů (Chiang et al., 2004; Avgustin et al., 2005) je spojena se zvýšenou expresí TDO a aktivací astrocytů vedoucí k akumulaci KYNA. Na druhé straně je Th1 dominantní imunitní odpověď častěji nalezena u závažné deprese, kde IDO a KMO jsou vyvolány cytokiny typu 1. Obdobně, u schizofreniků s Th1 dominantní imunitní odpovědí by se změny v kynureninové dráze více podobaly změnám nalezeným u deprese (Müller et al., 2009).

Nedávný preklinický výzkum odhalil, že vysoké dávky imunomodulačního melatoninu jsou neuroprotektivní a snižují negativní efekt QUIN. Stojí za to prozkoumat, zda melatonin zmírní efekt IDO aktivace vyvolané LPS v neurálním vývoji.

Zapojené subjekty:

NUDZ – prof. MUDr. Jiří Horáček, PhD.; RNDr. Karel Valeš, PhD; MUDr. Tomáš Páleníček, PhD.; ing. Martin Kuchař, PhD.

<u>Aktivita 2 – Úloha neurosteroidů ve vývoji behaviorálního onemocnění</u>

Endogenní neurosteroidy modulují kortikální vývoj. Poté mohou alterace v hladinách neurosteroidů přispět k abnormálnímu neurovývoji. Cílem je prozkoumat roli neurosteroidu po perinatální imunitní stimulaci (aplikací LPS) a vystavení stresu biochemickou analýzou obsahu mozku a behaviorální studií v neurovývojových animálních modelech schizofrenie a deprese. Předpokládáme, že rozmnožení neuroaktivních steroidů během vývoje může znamenat novou profylaktickou farmakoterapii behaviorálního onemocnění.

Konkrétní kroky aktivity:

1) Mateřská expozice stresu během těhotenství (známé proměnlivé endogenní hladiny neurosteroidů) má za následek behaviorální deficity u dospělých potomků, jako je snížená ultrazvuková vokalizace (marker sociální poruchy) a snížená prepulzní inhibice.
2) Podobné alterace v perinatálních hladinách neurosteroidů v mozku by mohly nastat v reakci na závažný stres.
3) Pokud jde o neuroprotektivní roli účinků neurosteroidů v mozku plodu, mohou také existovat korelace mezi fetální koncentrací steroidů a vývojem centrálního nervového systému, hypotalamo-hypofýzo-adrenální osy (HPA) v následných fázích vývoje. Domníváme se, že neurosteroidy jsou součástí neuroprotektivních mechanismů, chrání mozek plodu před hypoxií/ischemií a současně podporují neurovývoj. Tyto nedostatky v expozici neurosteroidům mohou přispět ke zvýšení výskytu nežádoucích vzorců chování u dětí, které se narodí předčasně
4) Endogenní neurosteroidy modulují kortikální vývoj. Poté mohou alterace v hladinách neurosteroidů přispět k abnormálnímu neurovývoji. Tato zjištění napovídají, že konektivita mezi thalamem a kortexem se pravděpodobně mění působením neonatálních a raně postnatálních neurosteroidů a může vést ke ztrátě zábran ve frontálním kortexu. To otevírá možnost zvýšení nízkých hladin exogenními neuroaktvními steroidy.
5) Studovat metabolomické snímání otisků a profilování zaměřené na produkty neuroaktivních steroidů na membránových receptorech a peroxidace lipidů, odebrané ze vzorků plazmy a oblasti mozku.
6) Detekce specifických změn v obsahu neurosteroidů během vývoje v animálním modelu může vést k identifikaci nových a vysoce specifických nástrojů časné diagnózy.
7) Meta-analýza a korelace výsledků získaných v rámci studie.
8) Rozmnožení neuroaktivních steroidů může být strategie k udržení excitačně-inhibiční rovnováhy mozku během neurovývojových procesů.

Přirozeně se vyskytující neurosteroidy regulují mnoho funkcí centrální a periferní nervové soustavy, od vývoje až ke složitému chování. Neurosteroidy představují složitou skupinu dobře vyvážených endogenních sloučenin. Ty mohou modulovat funkci membránových receptorů pro různé neurotransmitery, jmenovitě $GABA_A$ receptory nebo NMDA receptory. Tyto mechanismy jsou pravděpodobně zodpovědné za jejich psychofarmakologické účinky a mohou vysvětlovat i jejich antidepresivní nebo antipsychotické účinky, stejně jako jejich pozitivní vliv na funkce učení a paměti.

Neurosteroidy se podílí na několika fyziologických a patologických procesech CNS, jako je reakce na stres, deprese, úzkost, schizofrenie nebo paměťový deficit. Antidepresivní účinky neuroaktivních steroidů byly popsány v animálních modelech i u pacientů. Bylo prokázáno, že antidepresivní léčba normalizovala nerovnováhu pregnanolonu 3α a 3β u pacientů trpících depresí. Během sociální izolace je v animálním modelu depresivního chování významně snížena biosyntéza pregnanolonu. SSRI dokáží zvrátit sníženou hladinu pregnanolonu v mozku a korigovat behaviorální poruchy. Stejně tak chronický stres redukuje produkci alopregnanolonu i dalších GABAergických neurosteroidů.

Snížené hladiny neurosteroidů v plazmě a CSF jsou zjištěny u pacientů s vážnou depresí. Dlouhotrvající vystavení stresu může vyvolat snížení responsivity hypofýzy na vysoké koncentrace CRH, což

vede ke ztrátě citlivosti a následně ke snížené ACTH sekreci, která ovlivňuje syntézu neurosteroidů. Redukovaná ACTH reakce na chronický stres vede k hyper-responsivitě hypotalamo-hypofýzo-adrenální osy (HPA) na nové stimuly a vytváří zranitelnost vůči poruchám spojeným s náladou a úzkostí i depresi. Antidepresivní léčba normalizuje změněné hladiny alopregnanolonu, což nasvědčuje tomu, že změna GABAergické neurotransmise neurosteroidy má terapeutický efekt.

Několik linií důkazů napovídá, že neuroaktivní steroidy mohou přispět k patogenní roli psychosociálního stresu také u schizofrenie. Psychosociální stres vede k alteracím hladin cirkulujících neurosteroidů. Stejně tak stres působí změny v syntéze a metabolismu neurosteroidů, které pak hrají důležitou roli v neurobiologii behaviorální odpovědi na stres. Dále bylo prokázáno, že neurosteroidy hrají zásadní roli v regulaci dopaminergní neurotransmise. Konečně je prokázáno, že pacienti se schizofrenií projevují abnormality neuroaktivních profilů steroidů. A antipsychotika umí normalizovat abnormální hladiny neurosteroidů; neuroaktivní steroidy navíc také mají antipsychotický potenciál.

Mozek dokáže syntetizovat neurosteroidy již od doby embryogeneze. Později během vývoje neurosteriody regulují dendritický růst, tvorbu páteře a synaptogenezi v malém mozku (Sasahara et al., 2007). Bylo prokázáno, že podávání estradiolu podporuje dendritický růst a formování páteře v Purkyňových buňkách malého mozku (Sakamoto H. et al., 2003). Dále pak pregnenolon indukuje shlukování mikrotubulů (Marukami et al., 2000). Bylo zjištěno, že pregnenolon sulfát posiluje expresi adhezních molekul neuronálních buněk a stimuluje proliferaci v hipokampu (Mayo et al., 2005). Efekt neurosteroidů v průběhu tohoto vývoje je zprostředováván nejen receptory pro neurotransmitery, ale také nukleárními receptory (ERα a β) i jinými targety. Nedávno bylo objeveno, že přechodný receptor potenciálního kanálu melastatinu 3 (TRPM3) je modulován pregnenolon sulfátem. Aktivace TRPM3 pregnenolon sulfátem potencuje spontánní uvolňování glutamátu do neonatálních Purkyňových buněk během doby formování aktivní glutamátergní synapse (Zamudio-Bulcock et al., 2011).

Dále je působení neurosteroidů pravděpodobně zprostředkováno potlačením zánětlivé reakce (He J. et al., 2004), zajišťující neurotrofickou podporu zvýšením hladin neurotrofického faktoru pocházejícího z mozku (BDNF) (Stein a Wright, 2010), což redukuje peroxidaci lipidů a oxidační stres (Roof et al., 1997), podporuje remyelinizaci (De Nicola et al., 2006) a zabraňuje excitotoxicitě inhibicí NMDA receptoru a potenciací GABAA receptoru (Weaver et al., 1997).

Zapojené subjekty:

- Národní ústav duševního zdraví: RNDr. Karel Valeš, PhD; Ing. Martin Kuchař, PhD.
- Fyziologický ústav AV: prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc., doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc.