



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Sledování vlivu stresu a účinku psychotropik na hladiny podjednotek trimerních G proteinů a buněčné funkce in vitro a in vivo v kontextu depresivního onemocnění

MUDr. Marek Páv

Autoreferát disertační práce

Praha 2010

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Neurovědy.

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc

Školící pracoviště: Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN

Autor: MUDr. Marek Páv

Školitel: Prof. RNDr. Hana Kovářů, DrSc.

Školitel konsultant: MUDr. Anna Fišerová, CSc.

Oponenti: Prof. MUDr. Cyril Höschl, DrSc, FRCPsych

Doc. MUDr. Ivan Matouš-Malbohan, CSc

RNDr. Jiří Novotný, DSc

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.

kde

.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah

Souhrn	2
Úvod	4
Hypotézy a cíle práce	7
Materiál a metody	8
Stresový model	8
Cytotoxický test	8
C6 gliomové buňky	9
ELISA	9
Výsledky	10
Vliv stresu a účinek α -adrenergní a D2 dopaminergní antagonizace na hladiny $G\alpha$ a $G\beta$ G proteinových podjednotek v mononukleárních buňkách myší sleziny	10
Hladiny $G\alpha$ a $G\beta$ G proteinových podjednotek v myším mozku u stresovaných a kontrolních myší a účinek α - adrenergní a D2 dopaminergní antagonizace	11
Vliv stresu a adrenergní a dopaminergní antagonizace na cytotoxickou produkci přirozených zabíječů (NK buněk) ...	12
Vliv chronického podávání antidepressiv na hladinu $G\alpha$ G proteinových podjednotek C6 gliomových buněk	13
Vliv dlouhodobého podávání antidepressiv (desipramin, citalopramu a moklobemid na $G\alpha$ podjednotkové profily v mozku potkana.....	14
Diskuze	15
Závěr	19
Citovaná literatura	20
Seznam publikací	22

Souhrn

Deprese je systémové onemocnění s komplexní patofyziologií projevující se biologickými, kognitivními a psychopatologickými symptomy. Nalézáme narušení hormonální regulace, imunitní změny a narušení funkce zvláště monoaminergních a indolaminergních neuromediátorových systémů. Farmakologický zásah pomocí antidepressivně působících léků vede k odeznění depresivního syndromu i k úpravě homeostatické nerovnováhy.

Jak nervový, tak i imunitní a endokrinní systém využívá k přenosu signálu do vnitra buňky receptory spřažené s heterotrimerickými G proteiny (G proteiny). Předkládaná práce studuje změny vyvolané stresem u experimentálních myší v CNS a na periférii a antidepressivy vyvolané změny na úrovni hladin G proteinů v *in vitro* C6 gliomové linii a *in vivo* v tkáních laboratorního potkana.

Imobilizační stres u myší vyvolává významné změny v hladinách G proteinových podjednotek ve slezině i v CNS s obdobným profilem odpovědi. Výsledky poukazují na důležitost stresové dopaminergní komponenty v regulaci leukocytárních funkcí a vliv dopaminergní regulace na lymfocytární funkce bez vlivu stresu. Nález na gliomové linii pak ukazuje specifické antidepressivy vyvolané změny hladin G proteinových podjednotkových profilů a demonstrují tak mechanismus účinku nezávislý na inhibici vychytávání neurotransmiterů, který se může podílet na ovlivnění funkce buněčných kaskád iniciovaných membránovými G proteiny v neuronální i gliové buněčné populaci.

Abstract

Depression is a complex systemic disorder with exhibiting biological, cognitive and psychopathological symptoms. There are changes in hormonal regulation, immune changes and disturbance in function of especially monoamine and indoleamine neurotransmitter circuits in the CNS. Pharmacologic intervention with antidepressants is treating depressive syndrome as well as homeostatic imbalance. These neurotransmitter systems use in the signal transduction from membrane into the cell receptors coupled with heterotrimeric G proteins (GTP binding proteins). This thesis studies changes in G protein subunit levels induced by stress and psychotropic drugs in the CNS and immune system of experimental mice and antidepressant induced changes *in vitro* in the C6 glioma cell line and *in vivo* in the rat tissue. Immobilization stress induces prominent changes in the G protein subunit levels in the spleen and CNS of experimental mice with analogical profile of response. Results show importance of stress dopaminergic component in the leukocyte function regulation and also demonstrate importance of dopaminergic regulation without stress exposition. Findings obtained in the glioma C6 cell line show antidepressant induced drug specific changes of the G subunit profiles and demonstrate thus mode of action independent on the monoamine reuptake blockade, which can participate in the modulation of the signal transduction cascades initiated by G proteins in the neuronal and glial cell populations.

Úvod

Mezi neuromediátorové systémy s výrazným modulujícím vlivem na neuropsychiatrické a homeostatické funkce včetně regulace nálady a odpovědi na stresové podněty patří indolamin serotonin a monoaminy noradrenalin a dopamin. V současnosti užívaná antidepressivní terapie zvyšuje hladiny neurotransmiterů nebo různým způsobem ovlivňuje jejich receptorové systémy (Duman 2004, Sadock a Sadock, 2005, kap. 23,31). V přenosu signálu z membrány do nitra buňky důležitou roli hrají G proteiny. Po aktivaci receptoru agonistou asociované podjednotky G proteinu disociují a zvláště α podjednotky aktivují systémy druhých posílů s následnou aktivací kinázových kaskád. Rozhodujícími z hlediska mechanismu účinku antidepressivní léčby se jeví být kaskády spřažené s $G\alpha_q/11$ a $G\alpha_s$ a $G\alpha_i$ podjednotkami aktivující protein kinázu C a kalcium/kalmodulin dependenní protein kinázu a cAMP-dependentní protein kinázu (PKA) (Popoli et al., 2000, Tiraboschi et al, 2004, Wettschurek a Offermanns, 2005, Duman et al., 2006).

Mezi vyvolávajícími faktory deprese jsou často nalézány stresové životní události. Dlouhodobé vystavení stresorům, které vyvolávají uvolnění monoaminů, může vést k depleci jejich zásob a rozvoji chování podobnému depresi, snížené monoaminergní rezervy poté činí organismus citlivějším k dalšímu stresu, u nemocných depresí je prokázáno snížení monoaminergního přenosu (Roth et al., 1998, přehled Anisman et al., 2008). Jedním z hlavních mechanismů,

kterým organismus reaguje na akutní a chronický stres je aktivace hypotalamo-hypofyzo-adrenální osy, u určité části depresivních nemocných (přibližně 50%) je porušena zpětnovazebná inhibice sekrece kortizolu (nonsuprese v dexametazonovém testu) (Tafet a Bernardini 2003, Watson et al., 2006).

Již delší dobu je známo, že depresivní onemocnění je spojeno s imunitními změnami, zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů jsou schopny vyvolat chování, které je charakterizováno snížením energie, anorexií, zhoršením pozornosti, snížením aktivity, spavostí a v jistých znacích je tedy analogické depresi (Kelley et al., 2003, Dantzer et al., 2004). Prozánětlivé cytokiny jako IL-1 nebo TNF- α mohou v CNS mít negativní vliv na procesy neuroplasticity a vyvolávat depresi podobné chování v animálních modelech (Koo a Duman, 2008). Buňky přirozené imunity, přirození zabíječi (NK) jsou velice citlivým ukazatelem úrovně psychologického stresu i fyzické zátěže, v průběhu stresové reakce jsou regulovány přímo i aktivitou CNS (Downing a Myian 2000). Nejkonzistentněji prokazovanou imunitní změnou u nemocných depresí na buněčné úrovni je snížená cytotoxicita NK buněk a snížení jejich absolutního počtu (Irwin et al., 1987, Zorrilla et al., 2001).

V rozvoji reakce na stresový podnět jsou relativně rychle uvolňovány katecholaminy: adrenalin, noradrenalin a dopamin, které jednak systémovou cestou, jednak specifitějším uvolňováním z nervových zakončení regulují komplexní reakci na stresový podnět

včetně ovlivnění buněčných efektorových funkcí a sekrece cytokinů (Stanford, 1995). Katecholaminy modulují cytokinovou síť pozitivním i negativním způsobem, za nejdůležitější molekuly jsou v tomto ohledu považovány adrenalin a noradrenalin, role dopaminu je mnohem méně prozkoumaná (Beck et al., 2004).

Hypotézy a cíle práce

Hlavním cílem práce je studovat psychofarmaka a stresem vyvolané změny buněčné signalizace na úrovni proteinů vázajících guaninové nukleotidy na buněčném a zvířecím modelu. Dalším cílem bylo studium cytokinové produkce v průběhu stresové reakce a studium cytotoxicity NK buněk a jejich ovlivnění psychotropní medikací v použitém stresovém modelu. Specifické cíle byly následující:

1. posouzení modulačního vlivu imobilizačního stresu na hladiny G proteinových α podjednotek v mozku experimentálních zvířat a jejich ovlivnění dopaminergní a adrenergní antagonizací
2. posouzení modulačního vlivu imobilizačního stresu na hladiny G proteinových α podjednotek slezinných mononukleárních buněk a jejich ovlivnění dopaminergní a adrenergní antagonizací

3. sledování vlivu imobilizačního stresu a dopaminergní a adrenergní antagonizace na cytokinovou produkci slezinných mononukleárních buněk
4. sledování vlivu imobilizačního stresu a dopaminergní a adrenergní antagonizace na cytotoxickou aktivitu přirozených zabíječů
5. sledování vlivu antidepresiv na hladiny G proteinových α podjednotek C6 gliomové buněčné linie při krátkodobém a dlouhodobém podávání
6. sledování vlivu antidepresiv na hladiny G proteinových α podjednotek v mozku laboratorního potkana při dlouhodobém podávání
7. sledování vlivu antidepresiv na hladiny G proteinových α podjednotek v různých orgánových systémech u laboratorního potkana

Materiál a metody

Stresový model

Byla použita osmítýdenní inbrední CBA/J zvířata, která byla podrobena standardizovanému 12 hodinovému protokolu omezení v pohybu. Nestresovaná kontrolní zvířata byla držena v původních klecích bez přístupu k vodě a potravě. Sulpirid, fentolamin a fyziologický roztok byly podány 30 minut před umístěním zvířat do kyvety. Na konci stresové procedury byla zvířata usmrcena a orgány byly odpreparovány k provedení dalších analýz.

Cytotoxický test

Metoda: Efektorové lymfocyty jsou smíchány s konstantním množstvím cílových buněk nádorové kultury značených izotopem ^{51}Cr při třech různých koncentracích, měřeno bylo množství uvolněného ^{51}Cr z lyzovaných cílových buněk.

C6 gliomové buňky

Buňky byly kultivovány v MEM mediu ve standardních podmínkách. Konfluentní kultury byly vystaveny účinkům antidepresiva po dobu 24 hod nebo 5 dní. Buňky byly poté promyty, homogenizovány a poté připraveny cholátové extrakty z membránových frakcí.

ELISA

V cholátových membránových extraktech byly analyzovány Ga subjednotky ELISA technikou s využitím našich polyklonálních protilátek proti C-terminálním dekaeptidům a řetězců Gas, Gai1,2 a

Gαq/11. Použili jsme ELISA techniku kompetitivní inhibice, modifikované užitím mikrotitračních destiček Maxisorp (NUNC) pro nekovalentní vazbu peptidu.

ELISA stanovení extracelulárních cytokinů ve vzorcích

Supernatanty odebrané po 24 hodinách inkubace slezinných mononukleárních buněk získaných ze zvířat stresového modelu byly kultivovány v CO₂ inkubátoru 24 hodin, následně byly centrifugovány a sebrané supernatanty byly použity ke stanovení hladin cytokinů pomocí Mouse DuoSet ELISA development systému.

Vliv antidepressiv na hladiny G proteinových podjednotek v orgánech laboratorního potkana

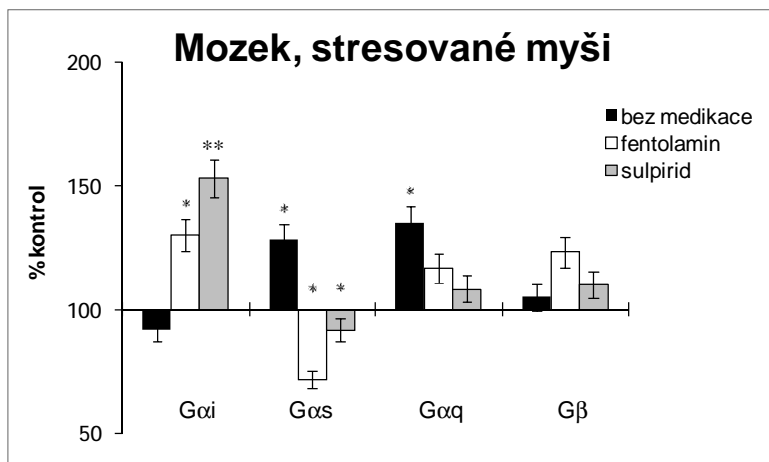
Byla použita zvířata kmene Wistar, chovaná za standardních podmínek. Antidepressivum bylo přidáno každý den po dobu 21 dní, následně byla zvířata usmrcena, byly vypreparovány mozky, sleziny a brzlíky a připraveny membránové frakce, ve kterých byly stanoveny hladiny Gα podjednotek výše uvedenou uváděnou ELISA technikou.

Statistická analýza

Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako střední odchylka (S.E.M.). Statistická významnost mezi skupinami byla Studentovým t-testem nepárových hodnot. P hodnoty nižší než 0,05 byly považovány za signifikantní (P < 0.05=*, P < 0.01=** a P < 0.001=***).

Výsledky

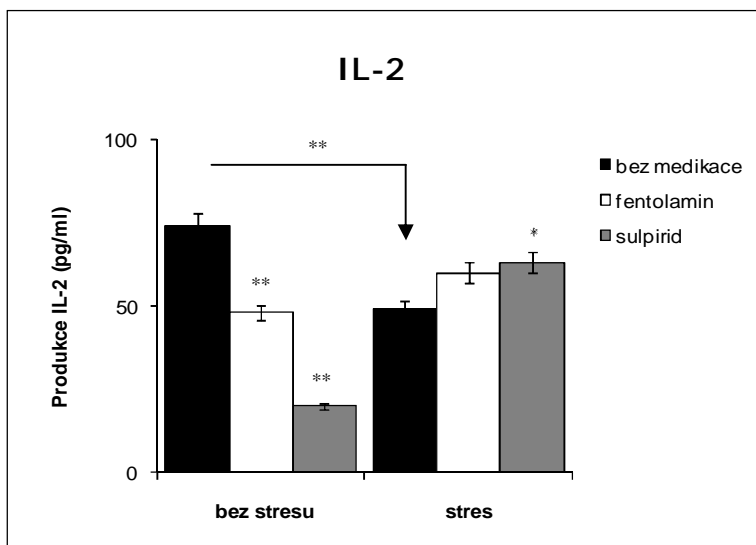
Graf 1. Hladiny Ga a Gb G proteinových podjednotek v myším mozku u stresovaných a kontrolních myší a účinek α -adrenergní a D_2 dopaminergní antagonizace



Stres vyvolává v mozku výrazné zvýšení hladin Gαs a Gαq G proteinových podjednotek $P < 0,05$ (*). α -adrenergní antagonist fentolamin signifikantně zvyšuje hladiny Gαi podjednotek při současném snížení hladin Gαs podjednotek $P < 0,05$ (*), hladiny Gαq podjednotek snižuje nesignifikantně. Dopaminergní antagonist sulpirid v mozku vykazuje analogický profil odpovědi se zvýšením hladiny Gαi $P < 0,01$ (**) a snížením Gαs podjednotek $P < 0,05$ (*). Profil odpovědi sulpiridu u slzinných mononukleárních buněk a

v mozku vykazuje analogii stejně jako v případě nestresovaných medikovaných zvířat (data v autoreferátu neuvedena).

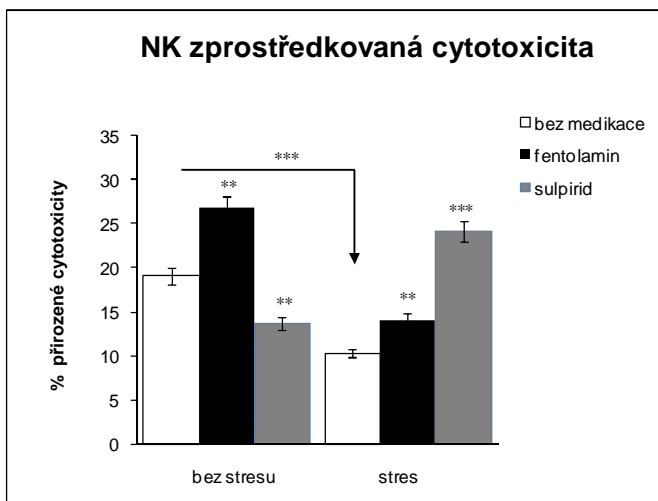
Graf 2. Produkce IL-2 slezinnými mononukleárními buňkami u stresovaných a nestresovaných zvířat a účinek adrenergní a dopaminergní antagonizace



Graf 2 ukazuje produkci IL-2 slezinnými mononukleárními buňkami u kontrolních myši a myši podrobených paradigmatu imobilizačního stresu medikovaných fentolaminem (bílé sloupce) a sulpiridem (šedé sloupce). Imobilizační stres vede k výraznému potlačení produkce IL-2 slezinnými mononukleárními buňkami na 66% hodnot zjištěných u nestresovaných zvířat $P < 0,01 (**)$. U nestresovaných zvířat jak fentolamin (bílé sloupce), tak i sulpirid (šedé sloupce) snižují produkci

IL-2 $P < 0,01 (**)$. U stresovaných zvířat sulpirid produkci IL-2 naopak zvyšuje $P < 0,05 (*)$, fentolamin ji statisticky významně neovlivňuje.

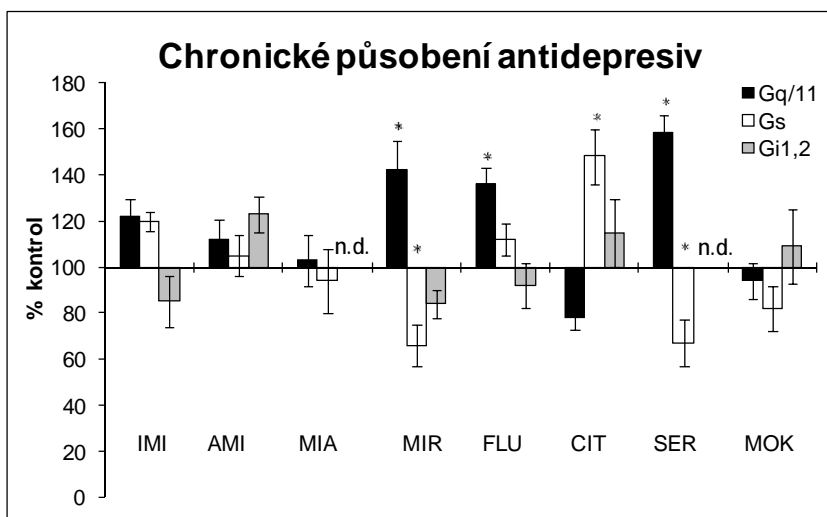
Graf 3. Vliv stresu a adrenergní a dopaminergní antagonizace na cytotoxickou produkci přirozených zabíječů (NK buněk)



Graf 3 ukazuje NK buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu po *in vivo* injekci adrenergního antagonisty fentolaminu (černé sloupce) nebo sulpiridu (šedé sloupce) ve srovnání s nemedikovanými zvířaty v obvyklých podmínkách či pod imobilizačním stresem. Stres vede k výraznému útlumu cytotoxických funkcí přirozených zabíječů $P < 0,001 (***)$. Aplikace sulpiridu vede k signifikantnímu zvýšení cytotoxických funkcí u stresovaných zvířat o 40% $P < 0,001 (***)$, zatímco u nestresovaných zvířat vede k útlumu cytotoxické aktivity

$P < 0,01 (**)$. Efekt fentolaminu byl statisticky významný ($P < 0,01$), proporcčně stejný ve srovnání s nemedikovanými kontrolami u obou skupin zvířat.

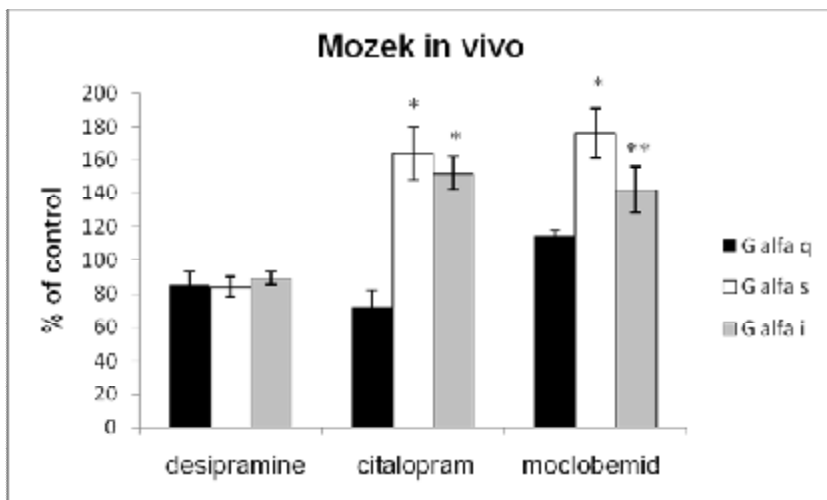
Graf 4. Vliv chronického podávání antidepresiv (imipraminu, amitriptylinu, minserinu, fluoxetinu, citalopramu, sertralínu a moklobemidu) na $G\alpha$ subjednotkové profily C6 gliomových buněk



Protože plný antidepresivní efekt nastupuje v průběhu několika týdnů, studium dlouhodobého působení je zásadní pro odhad změn *in vivo*, 5 denní expozice *in vitro* odpovídá 21 dnům podávání *in vivo*. Výsledky sumarizované v grafu 4 ukazují při chronické administraci statisticky významné $P < 0,05 (*)$ zvýšení hladiny $G\alpha q/11$ podjednotek jako efekt dlouhodobého podávání mirtazapinu, fluoxetinu a sertralínu. Profil mirtazapinem vyvolaného podjednotkového ovlivnění je obdobný

akutnímu efektu (data v autoreferátu nejsou uvedena), s redukcí hladiny $G\alpha_s$ podjednotek. Mirtazapin a sertralin vykazují analogický profil odpovědi se zvýšením hladin $G\alpha_q/11$ a redukcí $G\alpha$ podjednotek $P<0,05(*)$. Fluoxetin vyvolává zvýšení $G\alpha_q/11$ podjednotek při chronickém podávání $P<0,05(*)$, což je opak akutního působení. Citalopram oproti tomu zvyšuje hladiny $G\alpha_s$ podjednotek $P<0,05(*)$, celý profil odpovědi je analogický krátkodobému podávání. Tricyklická antidepresiva vyvolávají změny, které nejsou statisticky významné.

Graf 5. Vliv dlouhodobého podávání antidepresiv (desipraminu, citalopramu a moclobemidu) na $G\alpha$ podjednotkové profily v mozku potkana.



Výsledky zobrazené na grafu 5 ukazují, že tricyklické antidepresivum desipramin nevyvolává výrazné změny hladiny G proteinových podjednotek v mozku laboratorního potkana. Citalopram vyvolává signifikantní $P < 0,05$ (*) zvýšení hladin $G\alpha_s$ a $G\alpha_i$ podjednotek při současném snížení hladiny $G\alpha_q$ podjednotek. Moclobemid vyvolává v mozku *in vivo* zvýšení hladin $G\alpha_s$ a $G\alpha_i$ podjednotek $P < 0,05$ (*). V porovnání odpovědi farmak v obou modelech se ukazuje signifikantní vliv moclobemidu *in vivo*. Citalopram *in vivo* zvyšuje stejně jako v *in vitro* kultuře hladinu $G\alpha_s$ $P < 0,05$ (*). Na rozdíl od působení *in vitro* dochází i k signifikantnímu zvýšení hladiny $G\alpha_i$ podjednotek.

Diskuze

12 hodinový imobilizační stres u experimentálních myší vyvolává významné zvýšení hladiny $G\alpha_s$ a $G\alpha_q$ G proteinových podjednotek ve slezině i v mozku experimentálních zvířat. Na hladinu podjednotkových profilů má významný vliv dopaminergní blokáda, podání sulpiridu vede u nestresovaných zvířat ke zvýšení hladiny $G\alpha_s$ a snížení hladin $G\alpha_i$ podjednotek ve slezině i mozku experimentálních zvířat, u stresovaných zvířat naopak zvyšuje hladiny $G\alpha_i$ podjednotek při současném výrazném snížení hladiny $G\alpha_s$ podjednotek (graf 1). Po blokádě D_2 like receptorů (D_2 a D_3), které jsou negativně sprzęžené s adenylycyklázou může docházet ke zvýšení hladiny cAMP, zvýšení

hladiny cAMP je pak spojováno s celkovou imunosupresí včetně potlačení produkce cytokinů v leukocytárních buňkách. Toto je v souladu s obecně přijímaným imunosupresivním vlivem stresu a nález tak ukazuje na důležitost dopaminergní komponenty ve stresové odpovědi a na důležitý vliv fyziologických hladin dopaminu působícího hlavně cestou D₂ a D₃ receptorů na průběh imunitní odpovědi u nestresovaných zvířat i u zvířat vystavených stresu.

Sledované buněčné efektorové funkce jsou s výše uvedenými nálezy v souladu. U nestresovaných zvířat dochází k inhibici efektorové aktivity NK buněk (graf 3) a cytokinové produkce (graf 2). Důležitým výsledkem v tomto ohledu je nález výrazného potlačení produkce Th1 cytokinu IL-2 (graf 2), v porovnání obou skupin experimentálních zvířat (nestresovaná vs. stresovaná). Imobilizační stres vyvolává zvýšenou produkci prozánětlivých Th1 cytokinů TNF- α a IFN- γ při současném snížení produkce IL-2 a IL-4. Zatímco aplikace fentolaminu nevede ke zřetelnému ovlivnění cytokinové produkce (s výjimkou nesignifikantního zvýšení produkce IFN- γ u stresovaných zvířat), sulpirid vyvolává inverzní efekt. U nestresovaných zvířat má sulpirid imunosupresivní efekt a potlačuje produkci cytokinů, u zvířat vystavených stresovému paradigmatu vede ke zvýšení produkce IL-2 a IL-4. Stres má výrazně tlumivý vliv na cytotoxickou aktivitu NK buněk (viz graf 3), sulpirid u nestresovaných zvířat má inhibiční vliv, u stresovaných zvířat naopak tuto schopnost navrácí.

Je navrhována komplexní účast dopaminergního systému, zvláště mezolimbického systému odměny, v etiopatogenezi depresivního onemocnění i odpovědi na antidepressivní léčbu. U stresovaných zvířat v našem modelu dochází ke zvýšení $G\alpha_i$ a snížení $G\alpha_s$ podjednotek vlivem sulpiridu. Lze tedy vliv sulpiridu interpretovat jako antagonistický působení stresu v ovlivnění cAMP systému v CNS, což také odpovídá zcela opačné reaktivitě u medikovaných nestresovaných zvířat (data v autoreferátu nejsou uvedena). Dalším zajímavým výstupem je analogický profil odpovědi v mozku i slezině u stresovaných zvířat i obdobný profil odpovědi na blokádu D_2 i α adrenoreceptorů. Nalezené snížení hladin $G\alpha_s$ podjednotek vlivem obou typů použitých farmak poukazuje na blokaci stresem vyvolaného zvýšení v mozku i na periférii.

C6 gliomová linie je používána ke studiu vlivu antidepressivní medikace na hladiny $G\alpha$ podjednotek, nověji je používána i ke studiu produkce růstových faktorů účinkem jak antidepressiv, tak i atypických antipsychotik (Chen a Rasenick, 1985, Toki et al., 1999, Hisaoka et al., 2004, 2008). Při dlouhodobém podávání *in vitro* se antidepressiva ve svém vlivu na hladiny G proteinových podjednotek dají rozdělit na 4 skupiny: zvyšující hladiny $G\alpha_q/11$ podjednotek (mirtazapin, fluoxetin, sertralin), zvyšující $G\alpha_s$ (citalopram), snižující $G\alpha_s$ při zvýšení $G\alpha_q/11$ (mirtazapin, sertralin) a léčiva hladiny G proteinových podjednotek neovlivňující (imipramin, moklobemid).

Výsledky tak celkově podporují nálezy, které navrhují ovlivnění transdukčních drah v závislosti na na typu antidepresiva. Rozdíl v G proteinových profilech u léků řazených do jedné skupiny a zároveň analogický profil odpovědi u léčiv farmakologicky řazených do různých tříd naznačuje společné subcelulární cílové kaskády, toto ovlivnění se sbíhá na úrovni transkripčních faktorů a následné modulaci přepisu genů spojenými s plastickými procesy. Na rozdíl od tricyklických antidepresiv, která ve svém mechanismu účinku neovlivňují G proteinové hladiny, novější antidepresiva moduluji hladiny G proteinových subjednotek mnohem výrazněji. Všechny tyto nálezy demonstrují přímé ovlivnění G proteinů, které je nezávislé na inhibici vychytávání neurotransmiterů nebo interakci s receptory.

Nálezy *in vivo* ukazují analogie v odpovědi hladiny G α s podjednotek G proteinů v mozku a slezině jako odpověď na antidepresivní léčbu. Zvýšení hladiny G α s podjednotek ve slezině laboratorního potkana může mít vliv na leukocytární hladiny cAMP které je spojováno s celkovou imunosupresí včetně potlačení produkce cytokinů v leukocytárních buňkách. Tento mechanismus se může uplatňovat i v CNS, kde může též docházet k ovlivnění produkce prozánětlivých molekul nonneuronálními buněčnými elementy. Imunomodulační působení citalopramu pak může tvořit jeden z jeho mechanismů účinku, který může působit synergicky s jeho vlivem na hladiny neurotransmiterů a ovlivněním receptorových systémů.

Závěr

Výsledky poukazují na důležitost stresové dopaminergní komponenty v regulaci leukocytárních funkcí i vliv dopaminergní regulace na lymfocytární funkce bez vlivu stresu. Nálezy na gliomové linii pak demonstrují přímé ovlivnění G proteinů antidepresivy, které je nezávislé na inhibici vychytávání neurotransmiterů nebo interakci s receptory, které se může podílet na ovlivnění funkce buněčných kaskád iniciovaných membránovými G proteiny v neuronální i gliové buněčné populaci. Použitý model gliomové buněčné linie dává též možnost studia změn v gliální populaci působením antidepresivně působících farmak, která se jeví být z pohledu problematiky deprese možným terapeutickým cílem. Nálezy také demonstrují určité analogie v odpovědi hladiny G proteinových podjednotek v mozku a imunitním systému. Výsledky poukazují na analogický profil odpovědi experimentálních myší na imobilizační stres v mozku i slezině i obdobný profil odpovědi na blokádu D_2 i α adrenoreceptorů a jsou tak ukázkou obdobné regulace na úrovni centrální i periferní v nervovém a imunitním systému. Profil ovlivnění produkce cytokinů nepotvrzuje jednoznačný posun TH1/TH2 rovnováhy expozicí imobilizačnímu stresu v trvání 12 hodin, výsledky nicméně poukazují na důležitost dopaminergního systému v regulaci produkce cytokinů za fyziologických podmínek i v průběhu stresové reakce.

Citovaná literatura

- 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):1-74.
- Beck, G.Ch., Brinkkoetter, P., Hanusch, C., Schulte, J., van Ackern, K., van der Woude, F.J., Yard, B.A. (2004) Clinical review: Immunomodulatory effects of dopamine in general inflammation. *Crit Care.* 8(6): 485–91.
- Chen, J., Rasenick, M. (1995) Chronic treatment of C6 glioma cells with antidepressant drugs increases functional coupling between a G protein (Gs) and adenylyl cyclase. *J Neurochem.* 64(2):724-32.
- Dantzer R. (2004) Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity, *Eur. J. Pharmacol.* 500(1-3):399–411.
- Downing, J.E., Miyan, J.A. (2000) Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol.Today.* 21(6):281-9.
- Duman, R.S., Monteggia, L.M. (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 59(12):1116-27.
- Hisaoka, K., Nishida, A., Takebayashi, M., Koda, T., Yamawaki, S., Nakata, Y. (2004) Serotonin increases glial cell line-derived neurotrophic factor release in rat C6 glioblastoma cells. *Brain Res.* 1002(1-2):167-70.
- Hisaoka, K., Maeda, N., Tsuchioka, M., Takebayashi, M. (2008) Antidepressants induce acute CREB phosphorylation and CRE-mediated gene expression in glial cells: a possible contribution to GDNF production. *Brain Res.* 1196:53-58.
- Irwin M, Smith, T.L., Gillin, J.C. (1987) Low natural killer cytotoxicity in major depression. *Life Sci.* 41(18):2127–33.
- Kelley, K.W., Bluthé, R.M., Dantzer, R., Zhou, J.H., Shen, W.H., Johnson, R.W. Broussard, S.R. (2003) Cytokine-induced sickness behavior, *Brain Behav Immun* 17 Suppl. 1: S112–S118

- Koo, J.W., Duman, R.S.(2008) IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(2):751-6.
- Kovářů, H., Kovářů, F. (2005) Basis of neuroimmunomodulation. In: *Základy neuroimmunomodulace* H.Kovářů, F.Kovářů, Galén, Praha.
- Popoli, M., Brunelo, N., Perez, J., Racagni, G. (2000) Second messenger-Regulated Protein Kinases in the Brain. *J Neurochem.*74 (1):21-33.
- Roth, R.M., Tam, S-Y., Ida, Y., Yang, J-X., Deutch, Y. (1988) Stress a mesocorticolimbic dopamine systém. *Ann NY Acad Sci.* 537:138-147.
- Sadock, B.J., Sadock, V.A. (2005) Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry, Eight Edition. Lippikott Williams & Wilkins. Vol.I a Vol.II.
- Stanford, S.C. (1995) Central noradrenergic neurones a stress. *Pharmacol Ther.*68:242-297.
- Tafet, G.E., Bernardini R. (2003). Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(6): 893– 903.
- Tiraboshi, E., Tardito, D., Kasahara, J., Morashi, S., Pruneri, P., Gennarelli, M., Racagni, G., Popoli, M. (2004) Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacology.* 29:1831-40.
- Toki S., Donati R.J., Rasenick M.M. (1999) Treatment of C6 glioma cells and rats with antidepressant drugs increases the detergent extraction of G(s alpha) from plasma membrane. *J. Neurochem.*, 73(3):1114-20.
- Zorrilla, E.P., Luborsky, L., McKay, J.R., Rosenthal, R., Houldin, A., Tax, A., McCorkle, R., Seligman, D.A, Schmidt, K. (2001). The Relationship of Depression and Stressors to Immunological Assays: A Meta-Analytic Review. *Brain. Behav. Immun.* 15(3):199-226.

Seznam publikací

Publikace v časopisech s IF (hodnota IF pro rok 2008)

Fišerová A, Starec M, Kuldová M, Kovářů H, Páv M, Vanucci L, Pospíšil M: Effects of D₂ dopamine and α -adrenoreceptor antagonists in stress induced changes on immune responsiveness. J Neuroimmunol. 130: 55-65, 2002. **IF 3,159**

Páv M, Kovářů H., Fišerová A., Havrdová E., Lisá V: Neurobiological aspects of depressive disorder and antidepressant treatment: role of glia. Physiol Res. 57: 151-164, 2008. **IF 1,653**

Páv M, Kovářů H, Kovářů F, Lisá V, Ondráčková-Zelníčková P, Fišerová A: Acute and chronic effects of antidepressants on the G-protein alpha subunit profiles in vitro and in vivo. Neuro Endocrinol Lett. 2009;30(5):592-8. **IF 1,359**

Kovářů H, Páv M, Kovářů F, Raboch J, Fišerová A: Cell signalling in CNS and immune system in depression and during antidepressant treatment: focus on glial and natural killer cells. Neuro Endocrinol Lett, 2009;30(4):421-8, **IF 1,359**

Kovářů H, Páv M, Kovářů F, Zelníčková P, Fišerová A: Effect of mitogenic lectin on lymphocyte and brain cortex cell activation. Neuro Endocrinol Lett. 2010;31(3):325-9. **IF 1,359**

Publikace v časopisech bez IF

Bob P, Zvolský P, Paclt I, Páv M, Pavlát J, Vyhnánková Z, Uhrová T, Žukov I. Disociativní komponenty v etiopatogenezi deprese, možnosti jejich sledování a terapeutického ovlivnění. Česká a slovenská psychiatrie, 2:81-85, 2002.

Bob P, Ptáček R, Pavlát J, Jasová D, Paclt I, Zvolský P, Páv M. Symptoms of complex partial epilepsy in depression and possibilities of prediction for anticonvulsants, Homeostasis in Health and Disease 43, str. 30-32, 2004.

Sekot M, Gurlich R, Maruna P, Páv M, Uhlíková P.: Hodnocení úzkosti a deprese u pacientů se zhoubnými nádory trávicího traktu. Česká a slovenská psychiatrie 5, 252-257, 2005.

Páv M: Komplexní účinek antidepresiv a bolest. Psychiatrie pro praxi. 3:130-134, 2009.

Kapitoly v monografii

Páv M, Kovářů H, Fišerová A, Lisá V, Sekot M. Účinek antidepresiv: korekce komplexní poruchy buněčné signalizace? Raboch J, Zrzavecká I, Doubek P (Eds). Nemocná duše-nemocný mozek:klinická zkušenost a fakta. Galen Praha, 151-157, 2006.

Páv M, Kovářů H, Fišerová A. Role astrocytů v etiopatogenezi deprese. Raboch J, Zrzavecká I, Doubek P. Nemocná duše-nemocný mozek: klinická zkušenost a fakta. Galen Praha, 157-161, 2006.

Sekot M, Gürlich R, Páv M, Uhlíková P, Maruna P: Měření úzkosti a deprese u onkologických pacientů. Measurement of anxiety and depression by oncological patients. Raboch, Jiří (Ed.) V. Česká psychiatrie a svět. Raboch, Jiří (Ed.) Praha, Galén, 245-247, 2004.

Žukov I, Vevera J, Páv M. Neurochirurgické výkony u násilně se chovajících jedinců. Raboch J., Zrzavecká I., Doubek P. (Eds). Psychiatrie v medicíně a medicína v psychiatrii. Praha, Galén, 289-290, 2002.

Kongresová abstrakta

Fišerová Anna, Kovářů Hana, Páv Marek, Kovářů František : Stress induced changes in G α and G β subunit levels of heterotrimeric GTP-binding proteins in brain and immune system of mice. Psychiatrie, 6, Suppl. 1, 14-15, 2002.

Kovářů H, Fišerová A, Páv M, Jiráček R, Kovářů F, Lisá V, Malbohan I: Effect of psychotropic drugs on G alpha profiles of brain and immune cells. Psychiatrie, 5 Suppl. 2, 59-60, 2001.

Kovářů H, Páv M, Fišerová A, Kovářů F, Lisá V, Zelníčková P, Matalová E, Malbohan I. Vliv antidepresiv na transmembránový přenos signálu. Psychiatrie, 9, Suppl.1. 61-63, 2005.

Kovářů H, Fišerová A, Páv M, Jiráček R, Kovářů F, Lisá V, Malbohan I: Effect of psychotropic drugs on G alpha profiles of brain and immune cells. Psychiatrie, 5 Suppl. 2, 59-60, 2001.

Kovářů H, Kovářů F, Páv M, Fišerová A, Lisá V, Raboch J, Malbohan I: Mechanismy účinku antidepresiv- neuroimunomodulační přístupy. Psychiatrie 11, Suppl.1, 39,2007.

Velenovská M, Fišar Z, Hrubý T, Kozelek P, Páv M, Žukov I. : Vliv kanabinoidů na aktivitu NA/K-ATPázy. Psychiatrie, 7. Suppl. 1, 54, 2004.