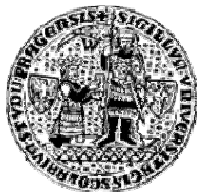


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE 1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Úloha vychytávání trijodthyroninu erythrocyty ve vztahu hypotalamo-pituito-thyroidální osy a depresivní poruchy

(Autoreferát doktorské dizertační práce)

MUDr. Lucie Kališová
Školitel: Doc. MUDr. Ivo Paclt, CSc.
Odborný konzultant: RNDr. Zdeněk Fišar, CSc.

Praha 2005

Dizertační práce byla vypracována v rámci externího doktorského studia v biomedicině, oboru neurovědy, na Psychiatrické klinice 1. LF UK a VFN Praha.

Autor: MUDr. Lucie Kališová
Adresa: Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN
Praha, Ke Karlovu 11, 128 00
Telefon: 224965358
Fax: 224923077
Email: lucie_starkova@yahoo.com

Obor: Neurovědy
Školitel: Doc. MUDr. Ivo Paclt, CSc.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:
Obhajoba se koná dne:

S dizertační prací je možné se blíže seznámit na studijním oddělení děkanátu 1. LF UK, Kateřinská 32, Praha 2.

Prof. MUDr. Jiří Tichý, DrSc.
předseda oborové rady

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mě na školicím pracovišti obklopovali a pomáhali mi nejen při vzniku této práce.

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Ivo Pacltovi, CSc. za odborné vedení v průběhu mého postgraduálního studia.

Velký dík patří odbornému konzultantovi RNDr. Zdeňkovi Fišarovi, CSc. za neocenitelnou všestrannou pomoc při realizaci experimentální části mé výzkumné práce.

V Praze 31.10.2005

OBSAH

I. TEORETICKÝ ÚVOD – LITERÁRNÍ PŘEHLED	5
1. PORUCHY NÁLADY - DEPRESIVNÍ PORUCHA.....	5
2. ZMĚNY FUNKCE HPT OSY V RÁMCI PORUCH NÁLADY.....	6
3. MEMBRÁNOVÉ CHARAKTERISTIKY DEPRESE.....	7
3.1. <i>Vychytávání L-trijodthyroninu (L-T3) erytrocyty.....</i>	<i>7</i>
3.2. <i>Membránová fluidita a její vliv na uptake L-T3.....</i>	<i>9</i>
II. PRAKTICKÁ - VÝZKUMNÁ ČÁST.....	10
1. CÍLE VÝZKUMNÉ PRÁCE.....	10
2. METODA.....	11
3. VÝSLEDKY.....	15
4. DISKUZE.....	22
5. SHRNUTÍ VÝZKUMNÉ ČÁSTI.....	23
III. SUMMARY.....	25
IV. LITERATURA.....	27
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	30

I. TEORETICKÝ ÚVOD – Literární přehled

1. Poruchy nálady - Depresivní porucha

Poruchy nálady (afektivní poruchy) jsou velmi častá onemocnění spojená s vysokou hladinou morbidity a mortality. Základním příznakem afektivních poruch je změna nálady. Nálada je buď patologicky elevovaná, pak mluvíme o mánii nebo patologicky snížena – mluvíme o depresi. Specifickým předmětem zájmu předkládané dizertační práce je deprese, proto si dovoluji v dalším textu vynechat popis poruch charakterizovaných náladou elevovanou (mánie) a věnovat se pouze depresivní poruše.

Současná civilizace klade stále vyšší nároky na jednotlivce. Vše se zrychluje, doba je anonymní a odosobněná. Lidé se stále více stěhují do velkých urbanistických center, což zhoršuje jejich pocity vykořeněnosti. Ne každý jednatel dokáže stále se zvyšující tlak a tep doby zvládnout. Mnozí, a jejich počet se stále zvyšuje, pocítují nepříznivé důsledky současné civilizace. Nejzávažnějším negativním důsledkem jsou civilizační onemocnění, z nichž přední místo zaujímá depresivní porucha.

Téma této práce je tedy aktuální a přínosné neboť depresivní porucha dnes postihuje značné množství lidí, přičemž její výskyt má ve vyspělých společnostech stoupající trend. Celoživotní prevalence deprese bývá uváděna mezi 8 – 20%, onemocní jí každoročně celosvětově zhruba 100 miliónů osob a depresivní epizodu prožije alespoň jednou za život každý pátý z nás (20% žen a 10% mužů). Deprese se vyskytuje hlavně v produktivním věku, mezi 25. a 35. rokem. Dvakrát častěji postihuje ženy. Je spojena s velkým subjektivním utrpením a vždy s narušením běžného denního fungování. Nemocní mají navíc 30krát vyšší riziko sebevraždy ve srovnání s normální populací

Deprese má významný negativní celospolečenský dopad. Deník Guardian v roce 2005 uvedl, že náklady na depresivní onemocnění a vše s ním spojené činí v případě Spojeného království 9 miliard britských liber ročně. Velkou část představují náklady plynoucí ze zhoršeného pracovního fungování nemocných.

Deprese se nevyhýbá nikomu, trpěla jí řada osobností, například L. van Beethoven, Vincent van Gogh, Virginia Woolfová, A. Lincoln, W. Churchill, a jiní.

V poslední době se informovanost o depresivní poruše zlepšila. Je lépe diagnostikována a léčena, což snižuje stigmatizaci depresí jako duševní poruchou.

Deprese má bohužel tendenci chronifikovat, nemocní mají 50% pravděpodobnost, že dojde k opakování epizody. Navíc některé osoby trpící depresivní poruchou neodpovídají adekvátně na antidepresivní terapii,

označujeme je k léčbě rezistentní. Přibližně polovina osob nezareaguje dostatečně na podání prvního antidepresiva, na druhý léčebný pokus jiným antidepresivem opět neodpoví asi 50% pacientů, tzn. 25% bývá označováno jako rezistentní k léčbě nejméně dvěma antidepresivy (Thase 2004).

Patogeneze deprese není dosud plně objasněna, i když probíhá intenzivní výzkum. Přesto lze ze získaných dat presumovat několik axiomů, zejména pak spojitost deprese s nerovnováhou neurotransmiterů a narušenou citlivostí receptorů v mozku, dále pak fakt, že příčiny vzniku deprese se jeví jako multifaktoriální.

2. Změny funkce HPT osy v rámci poruch nálady

Nepochybně existuje těsná spojitost mezi endokrinním a centrálním nervovým systémem, přičemž většina endokrinních poruch může být provázena změnami psychiky a vice versa. U afektivních poruch je nejčastěji zmiňováno narušení funkce hypotalamo-pituito-adrenergní osy, nicméně opakovaně byly různými studii potvrzeny také odchylky hypotalamo-pituito-thyroidní (HPT) osy.

Mezi nejčastějšími nálezy bývá uváděna změněná odpověď na podání hormonu uvolňujícího thyrotropin (TRH). Stimulační TRH test hodnotí hladinu thyrotropinu (TSH) před a po intravenózní aplikaci standardizované dávky TRH (200-500 µg). Test se provádí ráno a nalačno. Po podání TRH se sleduje hladina TSH po dobu 3 hodin ve 30 minutových intervalech. Oslabení odpovědi je uváděno jako zvýšení hladiny TSH o méně než 5 mU/l (delta TSH, $\Delta TSH < 5$). Hodnocení TRH stimulačního testu bylo provedeno v rámci výzkumu depresivních poruch mnohokrát. Většinou byla u depresivních osob nalezena odpověď snižená, ale několik studií demonstrovalo odpověď zvýšenou (Loosen a Prange 1982).

Mezi další časté nálezy řadíme přechodnou sérovou hyperthyroxinémii a oploštění diurnálního rytmu thyroïdního stimulačního hormonu.

U osob s depresí byly pozorovány také snížené hladiny transthyretinu v mozkomíšním moku. Transthyretin je specifický transportní protein, který je zodpovědný za vychytávání thyroxinu přes hematoencefalickou bariéru a jeho distribuci v mozku. (Sullivan a kol. 1999).

Některé studie uváděly zvýšení hladin TRH v mozkomíšním moku (Banki a spol. 1988).

Opakovaně byla v různých pracích zmiňována přítomnost imunitních změn u depresivních pacientů. Jde například o nález zvýšené hladiny protilátek proti thyroïdní peroxidáse (TPO-Ab) u žen s depresí nebo nárůst hladin imunoglobulinů zabraňujících navázání TSH na receptor.

Přítomnost těchto protilátek je běžným jevem u autoimunitních chorob štítné žlázy. Dispozice v podobě zmíněných protilátek a současná expozice stresu by mohla vést k depresi nebo k rozvinutí autoimunitního onemocnění. Podporovalo by to také hypotézu, že na pozadí depresivní poruchy je autoimunitní proces a že je zřejmá provázanost neuroendokrinních a imunitních změn (Konig a kol.1999).

Všechny uvedené parametry se zdají být state markerem, ve většině studií došlo ze zlepšením deprese k úplné či částečné normalizaci.

Věda diskutuje několik hypotéz, které by mohly objasnit změny ve funkci HPT osy u afektivních poruch. Jednou z nich je názor, že by se mohlo jednat o formu centrálního subklinického hypothyroidismu spojeného se systémovým euthyroidismem, nebo by mohlo jít o změny v důsledku sníženého množství serotoninu v mozku, či o pozměněnou aktivitu β -adrenergických receptorů v CNS, případně o centrální dysregulaci hypotalamo-pituito-thyroidální a hypotalamo-pituito-adrenergí osy.

Spojitosť HPT osy s afektivními poruchami dokládá i účinnost thyroïdních hormonů v jejich léčbě. V současné době se užívá trijodthyronin (T3) a thyroxin (T4) především v terapii rezistentních forem poruch. Vychází se z poznatku, že odchylky HPT osy mohou odrážet zvýšenou vulnerabilitu k relapsu onemocnění. V mnohých studiích byl prokázán příznivý potenciační účinek T3 na tricyklická antidepresiva, dosud však chybí kontrolované studie s jinými druhy antidepresiv. Thyroxin v suprafyziologických dávkách je účinný v terapii „rychle cyklující“ formy bipolární afektivní poruchy (Bauer a kol. 2005).

3. Membránové charakteristiky deprese

Propojenosť endokrinních a neuronálních systémů v rámci patogeneze deprese není vyjasněna. Při výzkumu jsme odkázáni na použití nepřímých metod, často se užívá buněčných modelů, zejména červených krvinek a krevních destiček; případně jejich membrán.

Roli při vzniku deprese totiž mohou hrát také vlastnosti buněčných membrán v určitých oblastech mozku, které následně ovlivňují změny v neurotransmiterových systémech. Charakteristiky lipidové části buněčných membrán by mohly hypoteticky rozhodovat o dostupnosti receptorových vazebných míst. Rovněž transport přes buněčnou membránu je ovlivněn jejím lipidovým složením a fluiditou.

3.1. Vychytávání L-trijodthyroninu (L-T3) erytrocyty

Dosud provedené studie prokázaly, že erytrocyty hrají roli v krevním transportu thyroïdních hormonů a je pravděpodobné, že existuje

souvislost mezi depresivním onemocněním a změnou parametrů vychytávání thyroïdních hormonů erytrocyty.

Vstup trijodthyroninu do erytrocytů může být považován za kompenzatorní mechanismus, který vyrovnává změny v dostupnosti thyroïdních hormonů pro cílové buňky. Moreau a spol. v roce 1999 pozorovali u krys změny kinetických parametrů vychytávání L-T3 v závislosti na změnách plasmatických hladin thyroïdních hormonů, tj. rychlost transportu byla zvýšena u hypothyroïdních krys a snížena u hyperthyroïdních. Je možné, že změny v transportu T3 jsou odrazem poruch na systémové úrovni.

Podle nejnovějších poznatků prostupuje T4 v lidských erytrocytech převážně volnou difúzí (Galton a kol. 1986). T3 naproti tomu vstupuje do erytrocytu usnadněnou difúzí, naváže se zde na cytosolové a membránové proteiny nebo lipidy, je zde akumulován, ale ne metabolizován (Samson 1992). Červené krvinky pravděpodobně slouží jako cirkulující zásobník T3 (Osty a kol. 1988, 1990). Trijodthyronin asociovaný s erytrocyty tvoří přibližně 25% z jeho celkového množství v plazmě.

Zmiňovaná usnadněná difúze T3 je uskutečňována pomocí stereospecifického saturovatelného přenašečového systému nezávislého na Na^+ . Zřejmě jde o transportní systém, který je shodný nebo podobný tzv. systému T pro aromatické aminokyseliny, L-tryptofan, L-fenylalanin a L-tyrosin (Rosenberg a kol. 1980, 1981). L-T3 a L-tryptofan na sebe zřejmě vzájemně působí kompetitivní inhibicí.

Výzkumy zabývající se tematikou transportu jednotlivých substrátů do buněk sledují zejména dvě nejlépe charakterizující veličiny, a to V_{\max} , což je maximální rychlost transportu do buňky odrážející existenci saturovatelného množství přenašečů, a K_M , což je zdánlivá Michaelisova konstanta, definovaná jako hodnota koncentrace transportované látky, při níž dosahuje rychlost transportu do buňky poloviny V_{\max} . Hodnoty K_M jsou blízké hodnotám disociačních konstant komplexů přenašeč-substrát a K_M je tedy také měřítkem afinity přenašeče k substrátu.

Doposud byly provedeny pouze dvě publikované studie zabývající se erytrocytárním uptake L-T3 u pacientů s afektivními poruchami. Jde o studii Moreau a spol. z roku 1998, kdy byly sledovány parametry vychytávání L-T3 a L-tryptofanu (tj. V_{\max} a K_M) u 34 v době studie neléčených klinicky euthyroïdních pacientů s unipolární depresí a u 40 zdravých kontrol. Autoři studie předpokládali, že následkem výše uvedeného vzájemného ovlivnění vychytávání L-T3 a L-tryptofanu, povede porucha vychytávání L-T3 k ovlivnění uptake L-tryptofanu a tím způsobí narušení syntézy mozkového serotoninu. Bylo zjištěno signifikantní zvýšení hodnot K_M a V_{\max} u depresivních pacientů oproti kontrolám, přičemž toto zvýšení nesouviselo s tíží deprese. Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi muži a

ženami. Byla pozorována negativní korelace mezi V_{\max} (ne však K_M) a věkem depresivních pacientů. Byla zjištěna také pozitivní korelace mezi V_{\max} pro uptake L-T3 a tryptofanu v červených krvinkách, což opět prokazuje, že zde jde opravdu zřejmě o sdílení společného transportního systému.

Druhá studie (Moreau a kol. 2000) navazovala na první. Sledovala vývoj uptake L-T3 erythrocyty u 19 klinicky euthyroidních depresivních pacientů v průběhu jednoměsíční léčby fluvoxaminem (patří mezi selektivní inhibitory reuptake serotoninu, SSRI). Výsledky byly srovnány se zdravými kontrolami. U respondérů na léčbu došlo během terapie k normalizaci kinetických parametrů až na úroveň zdravých kontrol, u non-respondérů se objevil naopak další vzestup další kinetických parametrů. Ze studie lze vyvozovat, že parametry uptake T3 do erythrocytů se mění při vzniku deprese, resp. podtypu deprese rezistentní na léčbu, a v průběhu její léčby.

3.2 Membránová fluidita a její vliv na uptake L-T3

Parametry vychytávání T3 erythrocyty mohou být ovlivněny změnami vlastností membránového přenašeče. Aktivita membránových přenašečů může být určena vlastnostmi lipidové části membrán, především složením a uspořádáním molekul v lipidové dvojvrstvě. Taktéž na afinitu L-T3 k transportnímu systému má určitý vliv interakce T3 s fosfolipidy v membráně (Hillier a kol. 1970, Samson 1996).

Plazmatická membrána je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, v níž jsou zanořeny nebo periferně uchyceny proteiny a glykoproteiny (model tekuté mozaiky). Poměr fosfolipidových molekul k molekulám proteinů je přibližně 50:1.

Molekuly ve fosfolipidové dvojvrstvě jsou ve stálém pohybu. V prvním přiblížení se lze dívat na vnitřek lipidové dvojvrstvy biologické membrány jako na homogenní neasociovanou izotropní nestlačitelnou kapalinu, jejíž vlastnosti jsou charakterizovány jedinou konstantou. V analogii s mechanikou kontinua je tato konstanta označována jako **viskozita** nebo **fluidita**, resp. **tekutost**. V případě lipidových dvojvrstev bylo zavedeno označení **mikroviskozita**. Fluidita je závislá na teplotě, ale hlavně na nenasycenosti zbytků mastných kyselin ve fosfolipidech a zastoupení cholesterolu nebo cukerných složek v membránových glykolipidech či glykoproteinech. Mikroviskozita, tj. převrácená hodnota fluidity, je používána pro vyjádření relativních změn dynamických vlastností membrány. Tyto změny lze kvalitativně sledovat měřením anizotropie fluorescence vhodných membránových fluorescenčních sond. Metoda fluorescenčních sond je založena na měření intenzity, emisních spekter nebo polarizace fluorescence malých hydrofobních nebo amfifilních molekul, jejichž fluorescenční parametry se mění v závislosti na některých vlastnostech jejich

mikrookolí. Obecně zvýšení anizotropie fluorescence sondy znamená zvýšení mikroviskozity (snížení fluidity). Nejčastěji používaná membránová sonda pro sledování změn mikroviskozity lipidových dvojvrstev je 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) (Fišar a Jiráček, 2001).

Membránová mikroviskozita je veličina ovlivňující vlastnosti řady membránových proteinů (receptorů, iontových kanálů, enzymů, přenašečů). V případě přenašeče pro L-T3 v erytrocytárních membránách byla závislost vazebných vlastností na fosfolipidovém složení membrán popsána (Samson a kol. 1996) Změny vlastností přenašeče by se možná daly vysvětlit např. změnami lipidového složení erytrocytárních membrán v případě, že by se jednalo o membránový protein závislý na lipidech. Změna ve složení membránových lipidů znamená rozdílné rozdělovací koeficienty psychotropních látek mezi vodnou fází a membránu, což by mohlo souviset s farmakorezistencí deprese.

II. PRAKTICKÁ - výzkumná část

1. CÍLE VÝZKUMNÉ PRÁCE

Dizertační práce je koncipována na bázi faktu, že funkce transmitterových systémů je obecně ovlivněna membránovým přenosem. Změny v buněčných membránách by mohly reflektovat změny na systémové úrovni.

V předchozí práci, kdy jsme měřili kinetické parametry vychytávání serotoninu do trombocytů, jsme potvrdili propojenost membránových změn (aktivity membránového přenašeče pro serotonin, SERT) a funkce centrálního serotoninového systému (Fišar a kol, 2005).

Předmětem této výzkumné práce bylo měření kinetických parametrů vychytávání L-trijodthyroninu, tj. V_{max} a K_M , které ukazují funkci transportních membránových systémů. Vycházeli jsme z následujících předpokladů:

- změněná schopnost vychytávání L-trijodthyroninu (L-T3) erytrocyty by mohla být markerem, který reflektuje narušenou funkci HPT osy a tím vulnerabilitu ke vzniku deprese;
- uptake triiodthyroninu může souviset se změnami vlastností buněčných membrán.

Základním cílem studie přitom bylo ověřit tyto stěžejní hypotézy:

1. membránový přenos L-trijodthyroninu je odlišný u pacientů s depresí a u zdravých kontrol a odráží změny na systémové úrovni;
2. funkce membránového přenašečového systému je ovlivněna změnou membránové fluidity;

3. užíváním antidepresiv dochází u pacientů s depresí k normalizaci parametrů.

Praktická část výzkumu byla provedena na buňkách izolovaných z periferní lidské krve. Uptake radionuklidem značeného L-T3 do erytrocytů byl měřen námi modifikovanou metodou a kinetické parametry byly určeny před léčbou a následně po 1 měsíci podávání citalopramu (antidepresivum působící primárně jako selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu) a byly porovnány se zdravými kontrolami.

Vzhledem k tomu, že aktivita transportéru pro L-T3 může být ovlivněna vlastnostmi lipidové části buněčné membrány, byly z erytrocytů izolovány plazmatické membrány (ghosty) a metodou fluorescenční spektroskopie byly určeny změny dynamických vlastností (fluidity) jejich lipidové dvojvrstvy.

Snažili jsme se zjistit, jaký vliv má deprese a podávání citalopramu na vlastnosti uptake L-T3 do erytrocytů a zda existuje korelace uvedených membránových změn, parametrů vychytávání L-T3 a klinického hodnocení. Na základě těchto výsledků byla diskutována úloha osy hypofýza-hypofýza-štítná žláza, vychytávání L-T3 do erytrocytů a úloha membránových lipidů při vzniku a léčbě afektivních poruch.

2. METODA

Charakteristika sledovaného souboru

Osoby s depresí

Studie se zúčastnilo 24 osob s depresivním onemocněním. Soubor byl získán náhodným výběrem pacientů s depresivní poruchou mírnou až těžkou první nebo opakovanou atakou (diagnózy F32.0 – F32.3.; F33.1-F33.2 dle klasifikace MKN 10) přijatých v letech 2000 a 2001 na Psychiatrickou kliniku 1. LF UK k hospitalizaci nebo k ambulantní léčbě. Zúčastnění nebyli v době zařazení do studie léčeni minimálně 5 měsíců žádnými antidepresivy. U 20 osob byla deprese diagnostikována prvně a nebyli dosud léčeni žádným antidepresivem („drug naive“). Z celkového počtu 24 pacientů (průměrný věk \pm S.D. = 37 ± 13 roků) bylo 12 žen (39 ± 10) a 12 mužů (35 ± 15).

Všechny zařazené osoby vyslovily s účastí souhlas a byly informovány o účelu a obsahu studie. Žádný z účastníků, nebyl v přímém či nepřímém vztahu k výzkumníkům nebo výzkumu.

Pacienti byli klinicky zhodnoceni Hamiltonovou škálou deprese (HAMD; Hamilton 1960) a Beckovou sebeposuzovací škálou deprese (BDI; Beck 1974), přičemž klinické hodnocení provedl stejný lékař vyškolený pro práci s uvedenými posuzovacími škálami.

Po klinickém hodnocení jsme odebrali mezi 8. a 10. hodinou ráno 8 ml krve na vyšetření hladin volného thyroxinu (fT4) a thyroidálního stimulačního hormonu (TSH) a 4 ml nesrážlivé krve na změření kinetických parametrů uptake L-T3 do erytrocytů a následné změření membránové fluidity.

Do studie byly zařazeny pouze klinicky euthyroidní osoby, které se neléčily žádnými léky, které by ovlivňovaly funkci HPT osy. Připomínám, že rozmezí normálních hodnot je 9,8 – 23,1 pmol/l pro fT4 a 0,500 – 6,00 mIU/l pro TSH. Vyšetření hladin fT4 a TSH u zařazených osob potvrdilo jejich klinicky euthyroidní status.

Po klinickém vyšetření a úvodních odběrech bylo depresivním pacientům nasazeno antidepresivum ze skupiny SSRI - citalopram (Seropram, Citalec). Dávkování citalopramu bylo v rozmezí 20 – 60 mg/den.

Po 1 měsíci (28 - 31 dní) byli pacienti znovu zhodnoceni klinicky Hamiltonovou a Beckovou škálou a byly odebrány 4 ml krve na změření kinetických parametrů vychytávání L-T3 a změření membránové fluidity erytrocytárních ghostů.

Při druhém hodnocení a odběru bylo vyřazeno 5 osob, a to z důvodu nesplnění kritérií studie (změna antidepresiva, vysazení antidepresiva, nebyl schopen přijít ve sjednaném termínu apod.)

Kontroly

Kontroly tvořily věkově odpovídající osoby, které se neléčily psychiatricky ani z důvodu poruchy štítné žlázy. Nešlo o osoby, které by byly v přímém vztahu k výzkumníkům nebo výzkumu. Celkový počet kontrol byl 19 osob. Kontrolám byly odebrány 4 ml krve na změření kinetických parametrů uptake L-T3 erytrocyty a na následné změření membránové fluidity erytrocytárních ghostů.

Použité chemikálie a roztoky

Roztok 800 nM [¹²⁵I]L-T3 o specifické aktivitě cca 16 kBq/ml byl připraven smísením pufru T (125 mM NaCl, 20 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM glukóza, 4,05 mM Na₂HPO₄, 0,95 mM NaH₂PO₄; před použitím probubláván 95% O₂ s 5% CO₂, pH 7) s roztokem neznačeného L-T3 (Sigma) a zásobním roztokem [¹²⁵I]L-T3 o specifické aktivitě 114 MBq/μg (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., England). Vzorky byly filtrovány přes filtry ze skleněných mikrovláken (Whatman, typ GF/C) impregnovaných v 0,1% polyetyleniminu (Sigma) a byly promyty puftrem A (120 mM NaCl, 10 mM KCl, 30 mM Tris, 10 μM L-T3, pH 7,4). Pro měření relativních změn

fluidity plazmatických membrán byla hydrofobní membránová sonda 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma).

Zpracování krve

4 ml nesrážlivé krve byly odebrány do sterilní vakuované zkumavky (BD Vacutainer 9NC s 0,129 M citrátem sodným jako antikoagulantem). Odebrané vzorky byly zpracovány během následujících 2 hodin po odběru. Krev byla promíchána a centrifugována v umělohmotných zkumavkách při 200 g, 20°C, 15 min. Poté byla odebrána plazma obohacená trombocyty i s horní vrstvou erymasy a pelet červených krevních buněk (RBC) byl 3 krát promyt chladným pufrem T (centrifugováno při 4°C, 1000 g, 10 min.). Následně byla změřena koncentrace erytrocytů a část vzorku byla naředěna na koncentraci 10^9 RBC/ml pro bezprostřední měření vychytávání L-T3; zbytek byl použit pro přípravu ghostů.

Uptake L-T3 do erytrocytů

Uptake trijodthyroninu do erytrocytů byl měřen modifikovanou metodou dle Osty a kol. (1990) a Moreau a kol. (1998, 2000). Promyté RBC naředěné pufrem T na koncentraci 10^9 RBC/ml byly použity pro měření kinetiky uptake L-T3. Saturační křivky byly změřeny pro 12 různých koncentrací L-T3. V umělohmotných zkumavkách bylo 200 μ l RBC ($2 \cdot 10^8$ RBC) naředěno různými objemy pufru T (1200-1790 μ l) a preinkubováno v 37°C po dobu cca 12 minut. Uptake L-T3 do erytrocytů byl startován přidáním 12 různých objemů (10-600 μ l) zásobního roztoku L-T3 o koncentraci 800 nM (Sigma), do něhož byl jako radioaktivní tracer přidán jodem 125 značený L-T3 ($[^{125}\text{I}]\text{L-T3}$), tak aby výsledná specifická aktivita zásobního roztoku byla kolem 16 kBq/ml (cca 10^6 CPM/ml). Výsledný objem vzorku pro měření uptake byl 2 ml, koncentrace buněk 10^8 RBC/ml. Objemy $[^{125}\text{I}]\text{L-T3}$ byly zvoleny tak, aby výsledné koncentrace L-T3 pro uptake do erytrocytů byly v rozmezí 4 nM až 240 nM. Po přidání značeného L-T3 byly zkumavky naplněny 95% O_2 s 5% CO_2 , uzavřeny a inkubovány v 37°C po dobu 15 minut. Bylo ověřeno, že i po této době dochází k přibližně lineárnímu nárůstu uptake L-T3 do buněk. Volný a nespecificky navázaný $[^{125}\text{I}]\text{L-T3}$ (tj. $[^{125}\text{I}]\text{L-T3}$ v roztoku mimo RBC nebo adsorbovaný na povrchu buněk) byl odstraněn rychlou filtrací vzorků přes filtry ze skleněných mikrovláken, filtry byly promyty a po přidání scintilačního roztoku proměřeny na scintilačním čítači LS 6000IC (Beckman).

Nesaturovatelný uptake L-T3 (pasivní transport) byl určen změřením vzorků při 2°C, tj. RBC byly před i po přidání $[^{125}\text{I}]\text{L-T3}$ inkubovány v ledové vodě.

Příprava erytrocytárních ghostů

Plazmatické membrány z erytrocytů (ghosty) byly izolovány postupem podle Dodge a kol. (1963). Stručně, erytrocyty byly 3 krát promyty pufr A (centrifugováno při 4°C, 1000 g, 10 min.) a poté byly naředěny hypotonickým pufr A (pufr A naředěný 20 krát destilovanou vodou) v poměru 1:30, pečlivě se promíchány a centrifugovány (20000 g, 4°C, 40 min). Supernatant byl pečlivě odstraněn a ghosty 3krát promyty hypotonickým pufr A. Nakonec byly ghosty resuspendovány v 1,5 ml pufru A, bylo odebráno 10 µl pro měření fosforu (podle Bartlett 1959, Wagner a kol. 1962) a vzorek byl zamražen pro následné měření membránové fluidity metodou fluorescenčních sond.

Metoda fluorescenčních sond

Pro měření relativních změn fluidity plazmatických membrán byla použita metoda fluorescenčních sond (Lakowicz 1999) s hydrofobní membránovou sondou 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienem (DPH, Sigma). DPH byl rozpuštěn v acetonu v koncentraci 6 mM a tento zásobní roztok byl uložen v mrazničce. Pro měření byly připraveny vždy čerstvé roztoky v pufru A v koncentraci 6 µM DPH. Tyto roztoky byly smíchány s pufr A a suspenzí ghostů tak, aby výsledná koncentrace DPH byla 2 µM a koncentrace fosfolipidů cca 100 µM. Po 60 minutách inkubace v 37°C byla měřena polarizovaná fluorescence při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 450 nm na spektrofluorometru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba). Každé měření daného vzorku bylo opakováno alespoň 10x a z výsledných hodnot byl vypočten průměr.

Analýza dat

Uptake L-T3 do RBC je pasivní zprostředkovaný transport (facilitovaná difúze), jehož vlastnosti lze charakterizovat analogickými parametry jako pro enzymovou kinetiku (rovnice Michaelise a Mentenové) nebo vazbu ligandů ke specifickým receptorům. Jedná se o přenos, který lze popsat zdánlivou Michaelisovou konstantou K_M a maximální rychlostí transportu V_{max} . Pro výpočet uvedených kinetických parametrů jsme použili nelineární regresní analýzu - program AccuFit Saturation Two-Site software (Beckman). Limitující prostupnost membrán za nízkých (fyziologických) koncentrací L-T3 byla počítána jako poměr V_{max}/K_M , kdy tento poměr je měřítkem efektivity transportního systému.

Statistická Analýza

Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (S.D.) nebo \pm interval spolehlivosti při hladině spolehlivosti 95% (CONF95). Pro srovnání odpovědí depresivních pacientů před a po léčbě citalopramem bylo použito Wilcoxonova párového testu. Mannův-Whitneyův U-test byl použit pro porovnání kontrol a depresivních pacientů před a po léčbě citalopramem. Spearmanův korelační koeficient R byl použit pro kvantifikaci vztahu dvou proměnných (v korelační matici byly chybějící hodnoty vynechány párově). Normalita rozdělení hodnot byla ověřena *Chi*-kvadrát testem a Kolmogorovovým-Smirnovovým testem. Použití *t*-testů a Pearsonova korelačního koeficientu dalo výsledky statistik velmi podobné jako při použití neparametrických metod uvedených výše.

3. VÝSLEDKY

Data týkající se pacientů účastnících se studie a kontrolní skupiny jsou uvedena v Tabulce 1. Byly změřeny kinetické parametry vychytávání L-T3 do erytrocytů u 24 osob s depresí před začátkem léčby a u 19 z nich po jednom měsíci farmakoterapie citalopramem v denní dávce 20 až 60 mg. Dále bylo provedeno 19 měření kontrolních vzorků od zdravých osob a byla testována hypotéza o nulovém rozdílu průměrných hodnot určených pro kontroly a pro depresivní pacienty před a po léčbě (Tab.2).

Vlivem léčby došlo u všech studovaných depresivních pacientů k významnému poklesu skóre v hodnocených škálách (mean \pm S.D.; BDI = $16,1 \pm 7,5$ před léčbou oproti $7,8 \pm 4,8$ po léčbě, $p=0,0002$; HAMD = $21,3 \pm 4,0$ před léčbou oproti $6,8 \pm 3,1$ po léčbě, $p<0,0001$).

Depresivní osoby před léčbou vykazovaly signifikantně významně vyšší hodnoty kinetických parametrů transportu L-T3 ve srovnání s kontrolami ($K_M = 166,5 \pm 68,2$ oproti $116,1 \pm 62,1$ nM, $p=0,019$; $V_{max} = 5,77 \pm 2,49$ oproti $3,67 \pm 1,77$ pmol/min $\cdot 10^8$ buněk, $p=0,0042$).

Po jednom měsíci léčby citalopramem zůstaly hodnoty parametrů uptake nadále zvýšené ve srovnání s kontrolními hodnotami ($K_M = 176,0 \pm 68,4$ oproti $116,1 \pm 62,1$ nM, $p=0,0093$; $V_{max} = 5,48 \pm 2,44$ oproti $3,67 \pm 1,77$ pmol/min $\cdot 10^8$ buněk, $p=0,015$).

Nebyla zjištěna statisticky významná změna měřených parametrů po jednoměsíční léčbě ve srovnání s hodnotami před jejím začátkem ($K_M = 166,5 \pm 68,2$ oproti $176,0 \pm 68,4$ nM, $p=0,66$; $V_{max} = 5,77 \pm 2,49$ oproti $5,48 \pm 2,44$ pmol/min $\cdot 10^8$ buněk, $p=0,71$). Ani při použití dvouvýběrového párového *t*-testu na střední hodnotu nebo při testování procenta změny parametrů K_M a V_{max} nebyly zjištěny významné změny po jednoměsíční léčbě citalopramem.

Při odděleném zpracování dat pro ženy a muže, zůstaly výsledky kvalitativně stejné, jako při celkovém vyhodnocení, pouze došlo v některých případech ke změně statistické významnosti pozorovaných změn.

Z hodnot K_M a V_{max} byla vypočtena limitní permeabilita (V_{max}/K_M) při nízkých (fyziologických) koncentracích L-T3. Ve srovnání s kontrolami nedošlo k významné změně tohoto parametru při depresi ($0,0356 \pm 0,0101$ oproti $0,0345 \pm 0,0105 \text{ min}^{-1}$, $p = 0,74$), ani po léčbě citalopramem ($0,0315 \pm 0,0095$ oproti $0,0345 \pm 0,0105 \text{ min}^{-1}$, $p = 0,37$). Nejvýraznější změna byla při srovnání hodnot před léčbou a po ní ($p = 0,19$).

V kontrolní skupině byly pozorovány statisticky významně nižší kinetické parametry uptake L-T3 ve skupině žen oproti mužům a to jak pro K_M ($85,6 \pm 65,4$ ku $143,5 \pm 43,5 \text{ nM}$, $p=0,044$), tak pro V_{max} ($2,80 \pm 1,72$ ku $4,45 \pm 1,41 \text{ pmol/min} \cdot 10^8 \text{ buněk}$, $p=0,045$).

Rozdíl mezi pohlavími byl také výrazný ve skupině depresivních osob před léčbou ($K_M = 133,9 \pm 53,4$ oproti $199,1 \pm 65,8 \text{ nM}$, $p=0,018$; $V_{max} = 4,94 \pm 2,66$ oproti $6,60 \pm 1,97 \text{ pmol/min} \cdot 10^8 \text{ buněk}$, $p=0,11$), zatímco po jednom měsíci léčby citalopramem nebyly pozorovány významné rozdíly mezi ženami a muži ($K_M = 179,8 \pm 73,2$ oproti $169,4 \pm 58,8 \text{ nM}$, $p=0,77$; $V_{max} = 5,68 \pm 2,26$ oproti $5,14 \pm 2,70 \text{ pmol/min} \cdot 10^8 \text{ buněk}$, $p=0,66$).

Nebyly zjištěny významně odlišné hodnoty kinetických parametrů u osob s prvně diagnostikovaným depresivním onemocněním a u osob, které byly již v době minulosti (před více než 5měsíci) léčeny antidepressivy.

Vzájemné vztahy mezi měřeními veličinami byly určeny propočtením matice korelačních koeficientů (Tab.3). Jak se dalo očekávat byla zjištěna významná závislost mezi klinickým hodnocením před léčbou a po 1 měsíci podávání citalopramu určená pomocí skóre HAMD ($r = 0,641$, $p = 0,003$) nebo BDI ($r = 0,633$, $p = 0,004$). Dále byly pozorovány významné korelace mezi hodnotami parametrů K_M a V_{max} a to jak před léčbou ($r = 0,819$, $p < 0,001$), tak po ní ($r = 0,749$, $p < 0,001$); tento vztah mezi K_M a V_{max} platí i pro kontrolní skupinu ($r = 0,921$, $p < 0,001$).

Následně byla změřena anizotropie fluorescence sondy DPH v erytrocytárních ghostech připravených ze stejných vzorků krve jako pro měření uptake L-T3. Výsledky ukazují, že u dosud neléčených depresivních pacientů před léčbou je anizotropie fluorescence DPH statisticky významně vyšší oproti kontrolám ($r_{DPH} = 0,2323 \pm 0,0065$ oproti $0,2279 \pm 0,0066$, $p = 0,034$). Po jenom měsíci léčby citalopramem došlo jen k nepatrnému poklesu tohoto parametru ($r_{DPH} 0,2316 \pm 0,0083$) (Tab.2). Nebyla zjištěna významná korelace mezi anizotropií fluorescence DPH v ghostech a ostatními měřeními veličinami (Tab.3).

Věk a klinické hodnocení deprese				
	Počet	Věk (roky)	BDI skóre	HAMD skóre
Pacienti s depresí před léčbou	24	37,3 ± 12,6	16,1 ± 7,5	21,3 ± 4,0
Pacienti s depresí Po 1 měsíci léčby	19	38,4 ± 12,3	7,8 ± 4,8***	6,8 ± 3,1***
Kontroly	19	35,6 ± 10,5	----	----

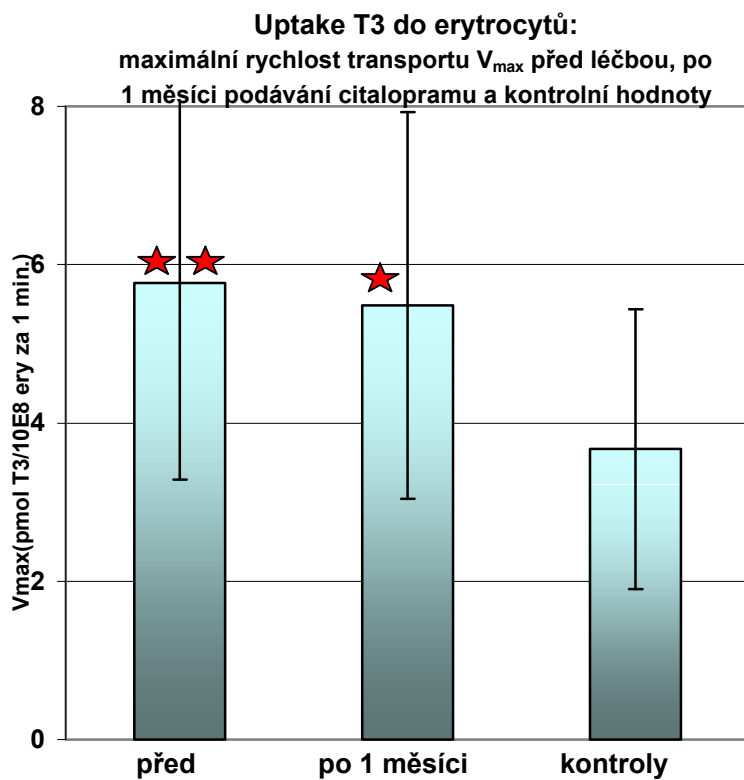
Tab 1. Věk a klinické hodnocení sledovaného souboru. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± S.D, označené hodnoty jsou statisticky významně odlišné od pacientů s depresí před léčbou na hladině *** $p < 0,001$; určeno Wilcoxonovým testem.

		K_M (nmol/l)	V_{max} (pmol/min · 10⁸ RBC)	V_{max}/K_M (ml/ min · 10⁸ RBC)	Γ_{DPH}
Depresivní pacienti před léčbou	mean	166,5*	5,77**	0,0356	0,2323*
	S.D.	68,2	2,49	0,0101	0,0065
	CONF95	27,3	0,99	0,0040	0,0026
	N	24	24	24	24
Depresivní pacienti po 1 měsíci léčby	mean	176,0**	5,48*	0,0315	0,2316
	S.D.	68,4	2,44	0,0095	0,0083
	CONF95	30,8	1,10	0,0043	0,0039
	N	19	19	19	18
Kontroly	mean	116,1	3,67	0,0345	0,2279
	S.D.	62,1	1,77	0,0105	0,0066
	CONF95	27,9	0,80	0,0047	0,0029
	N	19	19	19	20

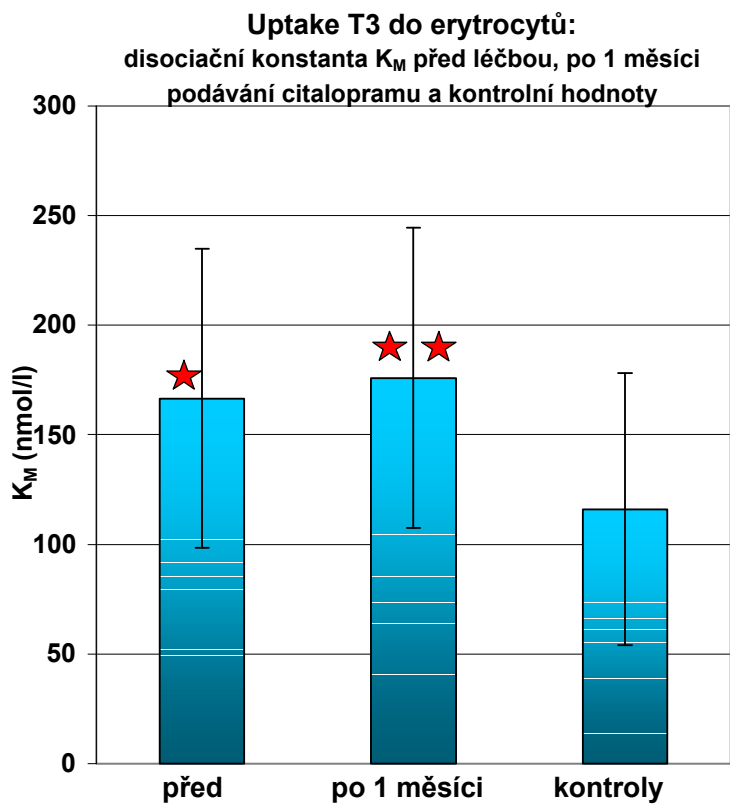
Tab 2. Kinetické parametry uptake L-T3 do erytrocytů a anizotropie fluorescence DPH erytrocytárních ghošťů depresivních pacientů a kontrol.

V_{max} - maximální rychlost vtoku L-T3 do buněk (pmol na 10⁸ RBC za 1 minutu); K_M - konstanta charakterizující koncentraci mimobuněčného L-T3, při níž je rychlost transportu rovna polovině maximální rychlosti (nmol/l); poměr V_{max}/K_M - reprezentuje permeabilitu při limitně nízké koncentraci L-T3; S.D. - směrodatná odchylka, N - počet hodnot, CONF95 - interval spolehlivosti pro střední hodnotu při hladině spolehlivosti 95%.

Označené hodnoty se signifikantně odlišují od kontrol na hladině * $p < 0,05$ nebo ** $p < 0,01$; použit Mannův-Whitněův test. Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly parametrů před a po 1 měsíci léčby.

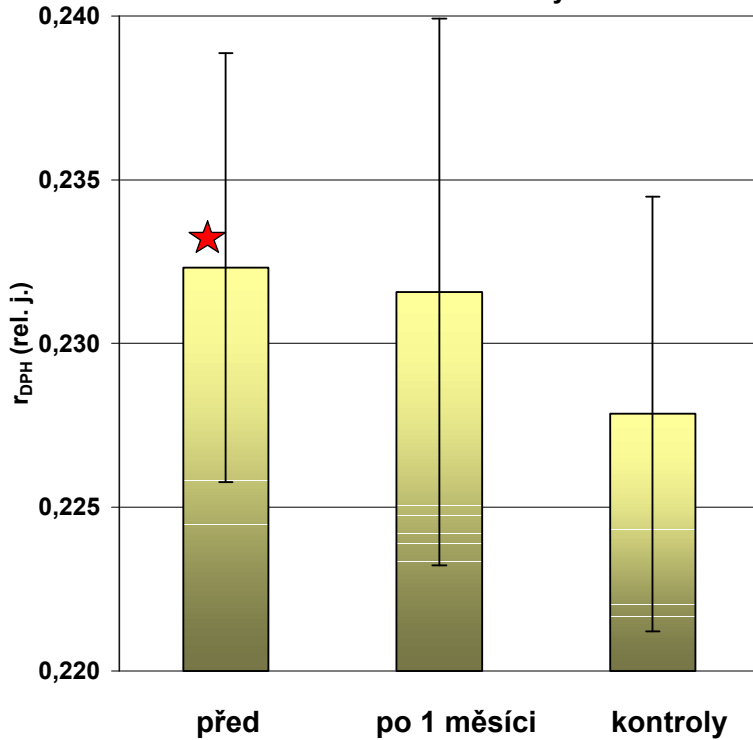


Graf 1. Maximální rychlost transportu – srovnání depresivních pacientů před léčbou, po 1 měsíci léčby a kontrol.



Graf 2. Disociační konstanta K_M – srovnání depresivních pacientů před léčbou, po 1 měsíci léčby a kontrol.

**Anizotropie fluorescence DPH v ghostech:
před léčbou, po 1 měsíci podávání citalopramu a
kontrolní hodnoty**



Graf 3. Anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH}) – srovnání depresivních pacientů před léčbou, po jednom měsíci léčby a kontrol

	Před léčbou					Po 1 měsíci léčby					
	BDI1	K_M1	$V_{max}1$	$V_{max}1/K_M1$	$r_{DPH}1$	HAMD2	BDI 2	K_M2	$V_{max}2$	$V_{max}2/K_M2$	$r_{DPH}2$
HAMD1	0.652**	-0.268	-0.080	0.226	0.372	0.666**	0.428	0.053	-0.258	-0.436	-0.063
BDI1	1.000	-0.464*	-0.466*	-0.086	0.212	0.339	0.583**	-0.089	-0.075	-0.301	-0.065
K_M1		1.000	0.850**	-0.178	0.097	-0.176	-0.339	0.223	0.119	0.114	0.164
$V_{max}1$			1.000	0.292	-0.058	0.034	-0.337	0.174	0.117	0.225	0.026
$V_{max}1/K_M1$				1.000	-0.293	0.202	-0.172	-0.088	-0.040	0.153	-0.172
$r_{DPH}1$					1.000	0.166	0.344	-0.172	-0.360	-0.284	0.061
HAMD2						1.000	0.543*	-0.041	-0.229	-0.405	0.031
BDI2							1.000	-0.001	-0.008	-0.108	0.143
K_M2								1.000	0.783**	-0.016	0.094
$V_{max}2$									1.000	0.591**	-0.172
$V_{max}2/K_M2$										1.000	-0.360

Tab 3. Korelace mezi klinickým hodnocením, parametry uptake L-T3 a anizotropií fluorescence sledovaného souboru pacientů s depresí před a po 1 měsíci léčby; Spearman R.

*HAMD – Hamiltonova škála hodnocení deprese, BDI – Beckova sebehodnotící škála deprese, K_M – zdánlivá Michaelisova konstanta pro uptake L-T3 do erytrocytů (nmol/l), V_{max} – maximální rychlost vtoku L-T3 do erytrocytů (pmol/min·10⁸ buněk), V_{max}/K_M – limitní prostupnost při nízkých koncentracích L-T3 (ml/min·10⁸ RBC), r_{DPH} – anizotropie fluorescence DPH v erytrocytárních ghostech; hodnoty označené “1” jsou před léčbou, “2” po 1 měsíci léčby citalopramem. Vyznačené korelace jsou signifikantní na hladině * $p < 0.05$ nebo ** $p < 0.01$*

4. DISKUZE

Prezentovaná data potvrzují úlohu červených krvinek v krevním transportu a homeostáze L-T3 a podporují tak hypotézu o pravděpodobné úloze HPT osy při depresivní poruše. Kinetika vychytávání L-T3 do erytrocytů je u deprese průkazně změněná. Získané výsledky ukazují, že kinetické parametry uptake L-T3 do erytrocytů jsou zvýšené u depresivních pacientů před počátkem léčby ve srovnání s kontrolami. Přestože všechny zařazené osoby byly klinicky euthyroidní, je možné považovat kinetické parametry vychytávání trijodthyroninu do erytrocytů za určitý subklinický marker narušení funkce HPT osy.

V průběhu farmakoterapie nedošlo v našem souboru k významným změnám. Všichni pacienti reagovali dobře na léčbu antidepresivy, nelze tedy ze získaných dat diskutovat problematiku farmakorezistence. Práce Moreau a kol. (2000) však popisuje větší narušení kinetických parametrů vychytávání L-T3 u pacientů nedostatečně reagujících na antidepresivní léčbu.

Dalším cílem naší studie bylo posoudit jaký vliv mají vlastnosti buněčných membrán, především fluidita, na erytrocytární uptake T3.

Byla zjištěna zvýšená anizotropie fluorescence sondy DPH v erytrocytárních membránách depresivních osob před léčbou i po 1 měsíci podávání citalopramu. Vzhledem k tomu, že anizotropie fluorescence DPH odráží stupeň omezení pohybu sondy v anizotropním membránovém prostředí a tedy i stupeň omezení pohybu membránových molekul, lze předpokládat, že na změně kinetických parametrů uptake L-T3 do erytrocytů při depresi se podílí změna interakcí lipid-přenašeč pro L-T3.

Interpretace námi zjištěného zvýšení kinetických parametrů uptake není zcela jednoznačná.

Vyšší V_{\max} může znamenat jednak větší denzitu přenašečů v membráně, nebo pouze jejich zvýšenou aktivitu při nezměněné hustotě. Tato zvýšená aktivita by mohla být způsobena např. specifickou interakcí s určitými membránovými molekulami a/nebo změněnými dynamickými vlastnostmi lipidové dvojvrstvy, v níž je přenašeč zanořen.

Zvýšená hodnota K_M odpovídá kvalitativně snížení afinity přenašeče pro L-T3, tj. snížení jeho schopnosti vychytávat volný L-T3, zvláště při jeho nízkých koncentracích. Toto snížení afinity vazebného místa pro L-T3 si lze představit buď jako důsledek konformační změny vazebného místa způsobené alosterickou interakcí s jinou molekulou, nebo jako důsledek zanoření celého proteinu hlouběji do lipidové dvojvrstvy a tím změněné dostupnosti vazebného místa.

Vliv dynamických vlastností membrány na změnu kinetiky uptake podporují také výsledky naší další práce (Vevera a kol. 2005) a dosud nepublikované studie, kdy jsme měřili uptake [¹²⁵I]L-T3 do erytrocytů u osob s hypercholesterolémií. Zvýšené plazmatické hladiny cholesterolu signifikantně korelovaly se zvýšenou anizotropií fluorescence DPH v erytrocytárních membránách a kinetické parametry uptake [¹²⁵I]L-T3 do erytrocytů (V_{\max} , K_M) byly také signifikantně zvýšeny ve srovnání s kontrolami. Celková účinnost vychytávání L-T3 do erytrocytů charakterizovaná poměrem V_{\max}/K_M však byla při hypercholesterolémií významně snížena.

Při výkladu změn kinetických parametrů uptake je nutno vzít v úvahu fyziologické koncentrace transportovaného ligandu. V případě volného L-T3 jsou totiž normální hodnoty v rozmezí 3,28 až 8,20 pmol/l a vzhledem k tomu, že zjištěné konstanty K_M leží v oblasti desítek až stovek nmol/l, je přenašeč pro L-T3 ve zcela nesaturovaném stavu. Při nízkých (fyziologických) koncentracích volného L-T3 roste úloha efektivity jeho vychytávání charakterizovaná afinitou přenašeče pro L-T3. Zvýšení V_{\max} u depresivních pacientů potom může být snadno kompenzováno zvýšením K_M (snížením afinity). Může potom dojít k situaci, kdy významně odlišné parametry kinetiky uptake znamenají větší rychlost transportu do erytrocytů při nanomolárních koncentracích volného L-T3, avšak při jeho pikomolárních koncentracích není rychlost transportu prakticky změněna. Změna kinetických parametrů uptake L-T3 do RBC při depresi je dle našich výsledků takto kompenzována a je otázkou, nakolik je změna V_{\max} a K_M vyvolávajícím nebo doprovodným znakem deprese.

5. SHRUTÍ VÝZKUMNÉ ČÁSTI

Ve výzkumné části této práce jsme se pokusili na periferním modelu, který představovaly červené krvinky, sledovat souvislost depresivní poruchy s parametry vychytávání L-trijodthyroninu. Uptake L-T3 do erytrocytů by mohl být odrazem narušení funkce hypotalamo-hypofýzo-thyroidní osy. Tato základní premisa byla současně doplněna o další, a sice o předpoklad ovlivnění transportu L-T3 přes membránu jejím složením.

Platí, že L-trijodthyronin je transportován přes erytrocytární membránu usnadněnou difúzí pomocí stereospecifického saturovatelného přenašečového systému nezávislého na Na^+ .

Cílem naší výzkumné práce bylo sledovat změny kinetických parametrů vychytávání, tj. maximální rychlost V_{\max} a zdánlivou Michaelisovu konstantu K_M a změny v membránové fluiditě.

Předmětem pozorování byl výzkumný vzorek složený ze 24 osob s depresivní poruchou, které byly podrobeny měření před léčbou a jeden měsíc po léčbě citalopramem. Dosažená výsledná data byla srovnána se skupinou 19 zdravých kontrol. Biochemické parametry byly korelovány s klinickým hodnocením dle škál pro depresi.

Všechny zúčastněné osoby odpověděly adekvátně na antidepresivní léčbu.

Funkce přenašeče pro L-T3 je u deprese změněna, neboť kinetické parametry vychytávání L-T3 do erytrocytů byly u depresivních pacientů před léčbou signifikantně zvýšené proti kontrolám.

Po jednom měsíci léčby citalopramem sice došlo k výraznému zlepšení depresivní symptomatologie, kinetické parametry však zůstaly zvýšené ve srovnání s kontrolami.

Dále jsme dospěli ke zjištění, že funkce přenašeče pro L-T3 souvisí také se změnami lipidové dvojvrstvy, ve které je přenašeč zanořen. Anizotropie fluorescence 1,6-difenyyl-1,3,5-hexatrienu (DPH) v erytrocytárních membránách, která odráží jejich mikroviskozitu (resp. fluiditu), byla signifikantně zvýšená ve skupině depresivních pacientů před léčbou ve srovnání s kontrolami. Po jednom měsíci léčby se neobjevila se téměř žádná změna, nedošlo k žádné normalizaci hodnot směrem ke kontrolám.

Výsledky výzkumné práce podporují hypotézu, že i u klinicky euthyroidních osob s depresí můžeme nalézt subklinické markery odrážející narušení funkce hypotalamo-hypofyzo-thyroidální osy v patofyziologii afektivních poruch. Potvrzují také hypotézu, že změněná funkce této osy vede ke změně uptake L-T3 do erytrocytů. Kinetické parametry uptake L-T3 do erytrocytů přitom nekorelují s depresivní symptomatologií a jsou ovlivňovány vlastnostmi lipidové dvojvrstvy.

Hypotéza o narušení funkce HPT osy byla tedy propojena s membránovou hypotézou afektivních poruch, podle níž může náchylnost k depresi vzniknout v důsledku změn složení biofyzikálních vlastností lipidové části buněčných membrán.

O uptake L-T3 do erytrocytů bychom tedy v konečném důsledku mohli hovořit jako o membránovém periferním markeru odrážejícím narušení HPT osy u deprese.

III. SUMMARY

At present, depressive disorders affect a considerable proportion of population, their incidence showing an increasing tendency in the developed world. Depression mostly afflicts people in the age of 25-35. It occurs in females twice as often as in males. Depression involves an intense subjective suffering accompanied with a disruption of normal everyday functioning. Moreover, when compared with the healthy population, there exists a thirty times higher danger of suicide in the people affected with depression. The illness unfortunately tends to become chronic, the probability of recurrence of an episode being 50%. Furthermore, some patients suffering from the depressive disorder do not adequately respond to an antidepressant therapy; we call such patients treatment-resistant.

There certainly exists a close relation between the endocrine and the central nervous system, most endocrine disorders being potentially accompanied with changes of psyche and vice versa. With affective disorders the most frequently reported disruption involves an interference with the function of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, though various studies repeatedly acknowledged also deviations of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis.

The most frequent findings comprise an altered serum thyrotropin response to thyrotropin releasing hormone, a transient serum hyperthyroxinemia, and flattening of the diurnal rhythm of the thyroid stimulating hormon.

Several hypotheses currently discussed in the medical science might elucidate changes in the function of the HPT axis in respect of affective disorders. One of them suggests it might be a form of the central subclinical hypothyroidism related to the system euthyroidism, or, alternatively, changes in the consequence of a lowered level of serotonin in the brain, or an altered activity of the beta-adrenerg receptors in the central nervous system, or the central dysregulation of the HPA and HPT axes.

The connection of the HPT axis with affective disorders is supported with efficacy of thyroid hormones in the affective disorder treatment. At present, the triiodothyronin (T3) and thyroxin (T4) are used in particular in the therapy of resistant forms of the disorders. The underlying knowledge being that the deflection of the HPT axis may reflect an increased vulnerability to a relapse of the disease. Many studies have shown a positive potentiating effect of the T3 with tricyclic antidepressants, however, controlled studies with other types of antidepressants are still missing. Thyroxin medicated in a suprphysiological dose is effective in the therapy of the rapid cycling form of the bipolar affective disorder.

The interconnection of the endocrine and neuronal systems in respect to the pathogenesis of depression has not been explained so far. In our research we have to rely on non-straightforward methods; cell models, in particular those of erythrocytes and thrombocytes, or their membranes, are frequently used.

Another factor playing its role in the emergence of depression is a characteristic of cell membranes in specific areas of the brain: it consequently influences changes in the neuromediator systems. The character of a cell membrane

might, hypothetically, decide about the accessibility of the binding site of a receptor. The transport via a cell membrane is influenced by its lipid composition and fluidity.

In the research part of the work we attempted, on a peripheral model represented by erythrocytes (RBC), to study the relation of the depressive illness to the parameters of the uptake of L-triiodothyronin (L-T3). The uptake of L-T3 might reflect an interference with the function of the HPT axis. The underlying assumption was supplemented with another one assuming that the transport of L-T3 via a membrane is under the influence of the composition of the membrane.

The fact is that L-T3 is being transported via erythrocyte membrane by means of the facilitated diffusion with help of the stereospecific saturable mediator system independent of Na^+ .

We aimed at monitoring changes of kinetic parameters of the uptake, i.e. V_{max} , maximal velocity, and K_m apparent Michaelis constant, and changes in membrane fluidity.

The object of our research was a sample comprising 24 individuals suffering from a depressive disorder; they underwent measuring before and one month after the treatment with citalopram. The resultant data were compared with a group of 19 healthy controls. The biochemical parameters were correlated with clinical assessment based on the depression scales.

All the patients involved adequately responded to the antidepressant treatment.

With depression, the function of the transmitter for L-T3 is changed, for the kinetic parameters of the uptake of L-T3 into erythrocytes were, before the treatment, significantly higher in the depressive patients compared to the controls. Furthermore, we have found out that the function of the transmitter for L-T3 is equally related to the changes of the lipid bilayer in which the transmitter seems to be immersed. The anisotropy of the fluorescence of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) in RBC membranes, which reflects their membrane microviscosity (and fluidity), was significantly increased in the group of depressive patients before the treatment in comparison with controls. After a month treatment there was virtually no alteration; no normalization of values towards controls took place.

The results of the research support the hypothesis that in clinically euthyroid patients suffering from depression we can find subclinical markers reflecting interference with the function of the HPT axis in the pathophysiology of the affective disorders; they also confirm the hypothesis that an altered function of the axis results in the change of the uptake of L-T3 into erythrocytes. The kinetic parameters of the uptake of L-T3 into erythrocytes, however, do not correlate with the depressive symptomatology and are affected by the characteristics of the lipid bilayer.

The hypothesis concerning disturbance of the function of the HPT axis was therefore interrelated with the membrane hypothesis of the affective disorders, which says that the vulnerability to depression can appear as a consequence of changes in the composition of biophysical characteristics of the lipid part of cell membranes.

We could therefore consider the L-T3 uptake into RBC to be a membrane peripheral marker reflecting the disturbance of the HPT axis in depressions.

IV. LITERATURA

Alpert JE, Fava M. An open study of triiodothyronine augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors in treatment-resistant major depressive disorder. *J Clin Psychiatry* 2005 ;66(8):1038-42.

Altschuler LL, Bauer M, Frye MA, et al. Does thyroid supplementation accelerate tricyclic antidepressant response? A review and meta-analysis of the literature. *Am J Psychiatry* 2001;158(10):1617-1622.

Banki CM, Bissette G, Arato M, et al. Elevation of Immunoreactive CSF TRH in Depressed Patients, *Am J Psychiatry* 1988; 145:1526 – 1531.

Bareš M, Praško J. Depresivní porucha. In: Seifertová D., Praško J., Hoschl C.: *Postupy v léčbě psychických poruch*. Praha, Academia Medica Pragensis, 2004: 67-93.

Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 1959; 234: 466-468.

Bauer M, London ED, Rasgon N, et al. Supraphysiological doses of levothyroxine alter regional cerebral metabolism and improve mood in bipolar depression. *Mol Psychiatry* 2005;10(5):456-69.

Beck AT, Beamesderfer A. Assessment of Depression: The Depression inventory. In: *Psychological Measurements in Psychopharmacology*. Ed. P. Pichot. Basel, Karger 1974, 151-169.

Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963;100: 119-130.

Fernstrom JD, Wurtman RJ. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma amino acids. *Science* 1972; 17:414-416.

Fišar Z., Anders M., Kališová L. Effect of Pharmacologically Selective Antidepressants on Serotonin Uptake in Rat Platelets. *Gen Physiol Biophys* 2005; 24: 113-128.

Fišar Z. Afektivní poruchy. In: Fišar Z., Jiráček R.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. Praha. Grada, 2001: 210-238.

Galton VA, St Germain DL, Whitemore S. Cellular uptake of 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine by red blood and thymus cells. *Endocrinology* 1996; 118:1918-23.

Hamilton MA. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1960; 23: 56-62.

Hillier AP. The binding of thyroid hormone to phospholipid membranes. *J Physiol* 1970; 211:585-97.

Hoschl C. Poruchy nálady (afektivní poruchy). In: Hoschl C., Libiger J., Švestka J. a kol.: Psychiatrie. Praha, Tigis, spol s r.o. 2002: 409-454.

Iosifescu DV, Nierenberg AA, Mischoulon D, et al. Red blood cell L-tryptophan uptake in depression: Kinetic analysis in untreated depressed patients and healthy subjects. *Psychiatry Res* 1996; 63:151-159.

Kirkegaard C, Korner A, Faber J. Increased production of thyroxine and inappropriately elevated serum thyrotropin levels in endogenous depression. *Biol Psychiatry* 1990;27:472-6.

Konig F, Von Hippel C, Petersdorf T. Thyroid Antibodies in Depressive Disorders. *Acta Med Austriaca* 1999; 26 (4): 126-8.

Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 1999.

Leathwood PD. Tryptophan availability and serotonin synthesis. *Proc Nutr Soc* 1987; 46:143-156.

Loose PT, Prange AJ, jun. Serum Thyrotropin Response to Thyrotropin-Releasing Hormone in Psychiatric Patients: A Review. *Am J Psych* 1982; 139:4, 405-414.

Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. revize. Duševní poruchy a poruchy chování. Diagnostická kritéria pro výzkum. Praha: Psychiatrické centrum Praha. 1996; Zprávy č. 134:179.

Moreau X, Azorin JM, Maurel M, et al. Increase in red blood cell triiodothyronine uptake in untreated unipolar major depressed patients compared to healthy volunteers. *Prog Neuropsychopharmacol.* 1998;22:293-310.

Moreau X, Lejeune PJ, Jeanningros R. Kinetics of red blood cell T3 uptake in hypothyroidism with or without hormonal replacement, in rat. *J Endocrinol Invest* 1999; 22(4): 257-61.

Mourek J., Pokorný J. Struktura a funkce membrány nervových buněk. *Čes a Slov Psychiat* 2005; 101 (3):155-159.

Osty J, Jego L, Francon J, et al. Characterization of triiodothyronine transport and accumulation in rat erythrocytes. *Endocrinology* 1988; 123:2303-2311.

Osty J, Valensi P, Samson M, et al. Transport of thyroid hormones by human erythrocytes: Kinetic characterization in adults and newborns. *J Clin Endocrinol Met* 1990; 71:1589-1594.

Rosenberg GR. A kinetic analysis of L-tryptophan transport in human red blood cells. *Biochim Biophys Acta* 1981; 649:262-268.

Rosenberg R, Young JD, Ellory JO. L-tryptophan transport in human red blood cells. *Biochim Biophys Acta* 1980; 598:375-381.

Samson M, Osty J, Francon J, et al. Triiodothyronine binding sites in the rat erythrocyte membrane: involvement in triiodothyronine transport and relation to the tryptophan transport system. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1108:91-98.

Samson M, Osty J, Thibout H. Solubilization, reconstitution and molecular properties of the triiodothyronine transport protein from rat erythrocyte membranes. *Eur J Endocrinol* 1996; 134:660-668.

Stárková L., Paclt I., Fišar Z. Vychytávání thyroidních hormonů erythrocyty ve vztahu k depresivním onemocněním. *Čes a Slov Psychiat* 2001; 8:430-433.

Styra R., Joffe R., Singer W. Hyperthyroxinemia in Major Affective Disorders. *Acta Psychiatr Scand* 1991; 83: 61-63.

Sullivan G.M., Hatterer J.A., Herbert J, et al. Low Levels of Transthyretin in the CSF of Depressed Patients. *Am J Psychiatry* 1999; 156:710-715.

Thase ME. Therapeutic Alternatives for Difficult to Treat Depression: A Narrative Review of the State of the Evidence. *CNS Spectr* 2004; 9(11):808-821.

Vevera J, Fišar Z, Stárková L, et al. Cholesterol-lowering therapy evokes time-limited changes in serotonergic transmission. *Psychiatry Res* 2005;133(2-3):197-203.

Wagner H, Lissau A, Holzi J, Horammer L. The incorporation of ³²P into inositolphosphatides of the rat brain. *J Lipid Res* 1962;3: 177-180.

Seznam použitých zkratk

HPT – hypotalamo-pituito-thyroidální

TRH – hormon uvoňující thyreotropin, thyreoliberin

TSH – thyreotropin, hormon stimující thyroideu

T4 - thyroxin

T3 - trijodthyronin

MKN 10 – mezinárodní klasifikace nemocí, verze 10

HAMD – Hamiltonova škála deprese

BDI – Beckova sebesuzovací škála deprese

TPO-Ab – protilátka proti thyroideální peroxidáze

DPH – 1,6-difeny1-1,3,5-hexatrien

V_{\max} – maximální rychlost transportu substrátu do buněk

K_M – zdánlivá Michaelisova konstanta

SERT – specifický serotoninový transportní protein

RBC – „red blood cells“, červené krvinky