

ODKRYWANIE TAJEMNIC SCHIZOFRENII – DEFICYT GLUTATIONU JAKO NOWY ZWIERZĘCY MODEL CHOROBY

Discovering the mysteries of schizophrenia –
glutathione deficit as a new animal model of the disease

Marta Lech (Kraków)

Streszczenie

Schizofrenia to chroniczna choroba psychiczna, na którą cierpi od 0,5 do 1% populacji. Przyczyny tej choroby mogą być zarówno genetyczne, jak i środowiskowe oraz neurorozwojowe. Naukowcy skłaniają się ku hipotezie, że deficyt glutationu w okresie wczesniemowlęcym prowadzi do ujawnienia się choroby w okresie dorosłym. W tym celu opracowano neurorozwojowy zwierzęcy model schizofrenii, polegający na obniżeniu poziomu glutationu w okresie postnatalnym przy użyciu związków: sulfoksyminy butioniny (BSO) i wanoxeryny (GBR). Słuszność tego modelu potwierdzają badania biochemiczne oraz testy behawioralne. Nowy model schizofrenii pozwoli naukowcom lepiej poznać tę chorobę i opracować nowe metody leczenia.

Abstract

Schizophrenia is a chronic mental illness that affects 0.5 to 1% of the population. The causes of this disease can be genetic, environmental and neurodevelopmental. Scientists are inclined to the hypothesis that glutathione deficiency in early infancy leads to the manifestation of the disease in adulthood. A neurodevelopmental animal model of schizophrenia was created, based on the reduction of glutathione levels in the postnatal period using BSO and GBR compounds. The validity of this model is confirmed by biochemical studies and behavioral tests. A new model of schizophrenia will allow scientists to better understand the disease and develop new treatments.

Schizofrenia to choroba zaliczana do psychoz endogennych, na którą cierpi około 0,5–1% populacji ludzkiej [12]. Rozwój tej choroby następuje w okresie wczesnej dorosłości, tj. około 20 roku życia, a jej pierwsze epizody mogą pojawiać się w okresie nastoletnim, a nawet dziecięcym. Schizofrenia może przybierać różne formy, w zależności od rodzaju przeważających objawów. Wyróżniamy trzy grupy objawów: pozytywne, negatywne oraz zaburzenia funkcji poznawczych. Symptomy pozytywne mają charakter wytwórczy i zaliczamy do nich: halucynacje, omamy słuchowe i wzrokowe, urojenia, a także pobudzenie psychoruchowe. Objawy negatywne to zniechęcenie, wycofanie z życia towarzyskiego, obniżenie nastroju

oraz trudności lub całkowity brak odczuwania przyjemności z pozytywnych rzeczy. Negatywne objawy są bliskie symptomom charakterystycznym dla depresji, która również występuje u osób chorych na schizofrenię [15]. Około 50% pacjentów zmaga się dodatkowo z depresją, która zazwyczaj utrudnia leczenie i pokonanie symptomów negatywnych [5]. U schizofreników obserwuje się także obniżenie funkcji poznawczych, takich jak uczenie się czy pogorszenie pamięci. Przebieg choroby jest bardzo zróżnicowany. U niektórych pacjentów dominują urojenia prześladowcze, u innych zupełne otępienie albo zauważalne zmiany nastroju. Ze względu na przewagę poszczególnej grupy objawów w terapii

farmakologicznej dobierane są leki o odpowiednim mechanizmie działania. Pacjentom z przewagą syndromów pozytywnych podaje się neuroleptyki blokujące receptory dopaminowe D2, które, o ile nie jest to odmiana lekoopornej schizofrenii, są dobrze przyswajalne i łagodzą wytwórcze objawy. W terapii objawów negatywnych oraz zaburzeń kognitywnych lepsze efekty terapeutyczne obserwuje się po zastosowaniu atypowych leków przeciwpsychotycznych, które głównie blokują receptory serotoninowe 5HT2 oraz w mniejszym stopniu dopaminowe D2. Atypowe leki przeciwpsychotyczne wykazują mniejsze objawy uboczne w stosunku do klasycznych neuroleptyków, a mianowicie nie wykazują zmian w układzie pozapiramidowym oraz nie zaburzają parametrów metabolicznych. Dlatego wydaje się, że terapia lekami nowej generacji, atypowymi lekami przeciwpsychotycznymi, może przynieść lepsze wyniki terapeutyczne niż klasycznymi neuroleptykami. Ważne dla powodzenia leczenia farmakologicznego są także psychoterapia i psychoedukacja [8].

Etiologia schizofrenii nie jest do końca poznana. Naukowiec sugerują, że główną rolę odgrywają geny, zmiany środowiskowe, infekcje przebyte we wczesnych okresach dzieciństwa lub urazy głowy. Ważnym czynnikiem jest również dziedziczność tej choroby oraz fakt, że w pierwszych okresach choroby wystąpienie objawów jest ściśle związane z wpływem czynników środowiskowych i stresorów. Warto również wspomnieć o związku substancji psychoaktywnych z rozwojem schizofrenii. Udowodniono, że niektóre substancje psychoaktywne mogą przyczynić się do wywołania początków choroby. Są to na przykład amfetamina i jej pochodne lub substancje psychodeliczne: LSD, ketamina czy fencyklidyna. Wymienione przez mnie substancje mogą być stosowane w celach badawczych do naśladowania objawów charakterystycznych dla schizofrenii u zwierząt laboratoryjnych. Natomiast w ostatnich latach zaczyna dominować hipoteza mówiąca o udziale zarówno genów, jak i czynników środowiskowych działających w okresie prenatalnym lub wczesnym postnatalnym, których efektami są deficyty w kluczowych dla rozwoju mózgu białkach, a co za tym idzie pojawienie się objawów charakterystycznych dla schizofrenii w życiu dorosłym [16, 1].

Do wspomnianych przez mnie białek zalicza się glutation (γ -glutamylcysteinyloglicyna). Jest to tripeptyd zbudowany z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny, o silnych właściwościach utleniających. Stanowi on najlepszy „zmiatacz” wolnych rodników, który utrzymuje homeostazę redoks w komórkach. Jest najbardziej roz-

powszechnym antyoksydantem w świecie zwierząt i występuje we wszystkich komórkach organizmu, a w szczególności w komórkach wątroby, nerek oraz mózgu. Deficyty w syntezie glutationu prowadzą do zaburzenia równowagi redoks, a w konsekwencji do wytworzenia stresu oksydacyjnego, który jest jedną z molekularnych przyczyn rozwoju schizofrenii. Badania ostatnich lat dowodzą, że upośledzenie syntezy glutationu i jego metabolizmu, a także wytworzenie stresu oksydacyjnego w okresie postnatalnym może indukować symptomy schizofrenii w życiu dorosłym. Skoro tak wiele przesłanek naukowych mówi o ważności utrzymania homeostazy glutationowej, a także o negatywnych skutkach, jakie niosą ze sobą nieprawidłowości w jego syntezie, postanowiono opracować pionierski model badawczy, odzwierciedlający wyżej wymienione warunki [6].

Modele zwierzęce służą do badania poszczególnych chorób lub schorzeń, które obserwuje się w klinice. W znaczącym stopniu odzwierciedlają interakcje komórkowe i tkankowe, które zachodzą w każdym żywym organizmie, co daje im przewagę nad modelami komórkowymi lub tkankowymi. Do opracowania modelu badawczego wykorzystuje się głównie gryzonia, gdyż są one powszechnie dostępne w firmach biochemicznych oraz są łatwe w hodowli. Gatunki gryzoni, które wykorzystuje się do badań, to w przewadze szczury, myszy, nornice oraz króliki. W modelach zwierzęcych zawsze trzeba wziąć pod uwagę płęć osobników. Najważniejszym jest, aby w całym eksperymencie była ona taka sama. Badając samice zawsze należy uwzględnić cykl menstruacyjny i profil hormonalny, który może zmieniać się w cyklu, a tym samym zaburzać wyniki badań. Zwierzęta muszą również być w tym samym wieku, z tej samej hodowli oraz mieć podobną wagę w momencie wykonywania testu. Wspomniany wcześniej neurorozwojowy model badawczy wykorzystuje szczury, samce rasy Sprague-Dawley, ale istnieją inne rasy, które są wykorzystywane, zależnie od tego, jakie założenia powinien posiadać badany model [4, 3].

Opracowany pionierski model zwierzęcy do badania schizofrenii zakłada zaburzenie homeostazy redoks w komórkach mózgu spowodowane deficytem glutationu w życiu wczesno-postnatalnym [13]. Aby uzyskać ten efekt trzeba doprowadzić do sytuacji, w której poziom wytwarzanego glutationu nie będzie wystarczający do utrzymania równowagi wolnych rodników tlenowych w komórkach. W zastosowanym modelu wykorzystano związek: BSO, który jest selektywnym inhibitorem syntezy glutationu, w dawce 3,8 mmol/kg oraz pochodną piperazyny o kodowej nazwie GBR 12909, która jest selektywnym

inhibitorem wychwytu zwrotnego dopaminy, w dawce 5 mg/kg, podawane oddzielnie lub w kombinacji. Połączenie GBR z obniżoną syntezą glutationu może powodować zmniejszenie gęstości dendrytów w korze czołowej. Co więcej, traktowanie BSO i GBR zaczyna się w 5. dniu po urodzeniu i trwa chronicznie do 16. dnia życia. Jest to okres wczesno-postnatalny, w którym odbywa się największa neurogeneza, czyli rozwój komórek mózgowych oraz wzmożona produkcja białek i innych czynników troficznych. Jest to okres rzutujący na całość rozwoju mózgu, a zatem nieprawidłowości wynikające z obniżeniem poziomu glutationu dają efekty w dorosłości poprzez symptomy schizofreniczne. Szczurom stanowiącym grupę kontrolną podawano sól fizjologiczną w takim samym schemacie, tj. od 5. do 16. dnia życia. Iniekcje z soli fizjologicznej służą do wykluczenia ewentualnych zmian spowodowanych stresem wynikającym z nakłucia i przytrzymania zwierzęcia. Zarówno sól, jak i badane substancje podajemy podskórnym. Po zakończonych chronicznych iniekcjach raz w miesiącu szczury są ważone oraz „handlingowane”, czyli przyzwyczajane do dotyku, aby w dalszych etapach badania dotyk człowieka nie był czynnikiem stresującym. Handling polega na oswojaniu, podnoszeniu, głaskaniu i ogólnej interakcji dotykowej ze szczurami, z każdym przez około 10 minut.

Aby sprawdzić poprawność nowego modelu, po trzech miesiącach dorosłe już szczury poddaje się odpowiednim testom behawioralnym. Im bliżej zaplanowanej daty wykonywania testów, tym handling jest bardziej regularny, a na dwa tygodnie przed testem przyzwyczajanie odbywa się codziennie. Testy te wskazują na pewne deficyty w zachowaniu szczurów traktowanych wcześniej wspomnianymi związkami, a to sugeruje wystąpienie objawów charakterystycznych dla schizofrenii. Ponadto dla całkowitego sprawdzenia słuszności modelu na dalszych etapach tkanki mózgu podlegają analizom biochemicznym, w których obserwuje się spadek w syntezie kluczowych dla rozwoju mózgu białek, a także zmiany zachodzące na etapie ekspresji genów.

Najpopularniejsze testy behawioralne, które wykorzystuje się do badania symptomów schizofrenicznych to: test integracji socjalnej, test rozpoznawania nowego obiektu, test otwartego pola, test podniesionego labiryntu krzyżowego oraz test bramkowania sensoryczno-motorycznego. Test integracji socjalnej polega na umieszczeniu dwóch nieznanym sobie osobników w klatce badawczej i obserwacji ich zachowania przez około 10 minut. Test ten bada trudności w nawiązaniu kontaktów społecznych, czyli objawy negatywne schizofrenii [10]. Test rozpoznania

nowego obiektu skupia się na pamięci operacyjnej i polega na umieszczeniu szczura na 5 min w boksie, w którym znajdują się dwa identyczne obiekty, a następnie po godzinie podmieniany jest jeden z obiektów na nowy, a po zmianie szczura umieszcza się na kolejne 5 min w boksie. Zdrowy szczur po pierwszej eksploracji boks powinien bardziej zainteresować się nowym obiektem i poświęcić mu więcej uwagi, która mierzona jest w czasie spędzonym przy danym obiekcie. Natomiast szczury, u których występują symptomy schizofrenii, nie zauważają różnicy między starym a nowym obiektem i w takim samym stopniu interesują się zarówno nowym, jak i starym obiektem [9].

Kolejnym zastosowanym testem jest test otwartego pola. Szczura umieszcza się na podniesionej, płaskiej platformie w kształcie koła. Nie ma tam żadnych dodatkowych elementów, zatem szczur eksploruje otwartą przestrzeń. Zdrowe szczury zwykle czują się niekomfortowo na takiej otwartej przestrzeni, natomiast szczury, które pozbawione są normalnej oceny rzeczywistości, często biegają po platformie i podchodzą do jej krawędzi [11]. Podobnie jest przy kolejnym teście – podniesionego labiryntu krzyżowego. Boks, w którym odbywa się test, ma kształt krzyża, którego dwa ramiona są obudowane i zamknięte, a dwa zupełnie otwarte. Reakcje szczurów są zbliżone do reakcji w otwartym polu, zdrowy szczur będzie zainteresowany nowym miejscem i, po sprawdzeniu wszystkich odgałęzień, wybierze to zamknięte i tam będzie przebywał. Schizofreniczne szczury są albo pobudzone i biegają po całym labiryncie, albo bardzo przestraszone i pozostają w zamkniętym ramieniu bez eksploracji reszty labiryntu, co wskazuje na efekty pro-łękowe, które również są obserwowane u pacjentów schizofrenicznych [17]. Wszystkie wymienione testy badają negatywne symptomy schizofrenii oraz zaburzenia funkcji poznawczych występujących w tej chorobie. Istnieją oczywiście testy badające symptomy pozytywne i jednym z nich jest test aktywności ruchowej, zwiększonej podaniem substancji noszącej nazwę MK-801 oraz amfetaminy. Szczury po iniekcji wykazują nadmierną ruchliwość psychomotoryczną, biegają i eksplorują otoczenie w chaotyczny i intensywny sposób, co odzwierciedla pozytywne objawy schizofrenii.

Dla lepszego poznania biochemicznych zmian zachodzących podczas deficytu glutationu wykonuje się eksperymenty molekularne. W prawidłowym rozwoju mózgu bierze udział szereg białek troficznych i regulatorowych. Jednym z tych białek jest neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF),

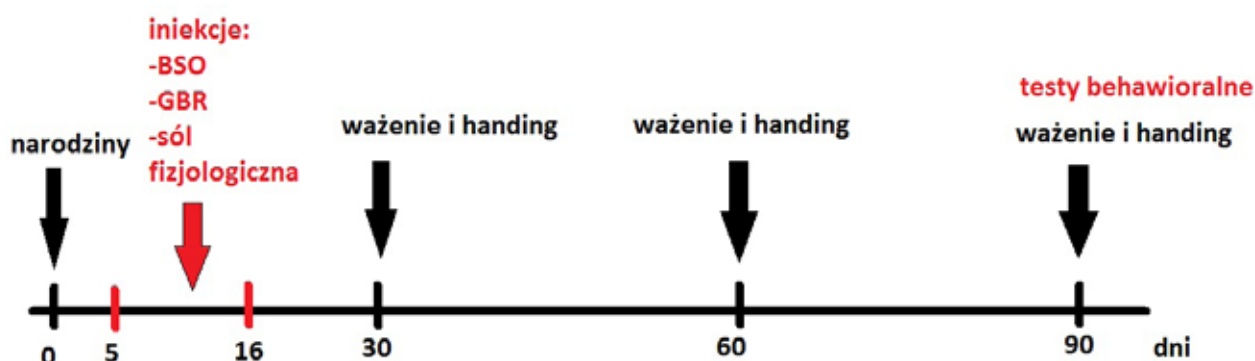
który między innymi warunkuje funkcjonowanie neuronów dopaminergicznych i cholinergicznych w mózgu, a także ma wpływ na rozwój motoneuronów i neuronów czuciowych [2]. Wstępne wyniki badań biochemicznych wskazują na to, że deficyt glutationu powoduje zmniejszenie ekspresji genu dla BDNF oraz znaczące obniżenie syntezy tego białka. Jak można się zatem domyślać, wiąże się to z licznymi nieprawidłowościami w rozwoju mózgu, objawiające się w dorosłości deficytami w zachowaniu, które zaobserwować można we wcześniej wymienianych testach behawioralnych. Również wstępne badania sugerują, że odpowiednie leczenie może minimalizować lub wręcz odwracać deficyty wywołane niedoborem glutationu [14].

Istnieje szeroka gama leków przeciwpsychotycznych, są to leki starej lub nowej generacji. Neuroleptyki, leki starej generacji, mają bardzo wiele skutków ubocznych, aczkolwiek pacjenci, u których przewa-

żają symptomy pozytywne, zwykle dobrze odpowiadają na leczenie. Problemem jest fakt, że w terapii schizofrenii leki trzeba przyjmować przez całe życie, a często pacjenci po tym, jak poczują się lepiej, podejmują sami decyzję o odstawieniu leczenia i niestety grozi to nawrotem objawów ze zwiększoną intensywnością. Mało wiemy o leczeniu symptomów negatywnych, połączonych ze zwykle towarzyszącą im depresją oraz o poprawie funkcji poznawczych. Wstępne badania sugerują, że odpowiednie łączenie leków przeciwpsychotycznych nowej generacji wraz z dobrze dobranym lekiem przeciwdepresyjnym może odwracać zmiany zachodzące u szczurów, zarówno na poziomie biochemicznym, jak i odwracać deficyty w testach behawioralnych. Dlatego bardzo istotne było opracowanie nowego modelu zwierzęcego, na którym obecnie naukowcy będą mogli dalej odkrywać tajemnice tej ciężkiej choroby – schizofrenii.

Tabela 1. Podział objawów występujących u pacjentów ze schizofrenią [na podstawie [5] w modyfikacji autorki].

Objawy pozytywne	Objawy negatywne	Zaburzenia funkcji poznawczych
-nadpobudliwość	-zubożenie emocjonalne	-koncentracji
-urojenia	-obniżenie aktywności	-pamięci
-omamy	-wycofanie	-uczenia się
-halucynacje	-obniżenie zainteresowania	-przetwarzania informacji
-agresja	-otępienie	-podejmowania działania



Ryc. 1. Schemat neurorozwojowego modelu zwierzęcego na przestrzeni 3 miesięcy życia szczura [schemat własny].



Ryc. 2. Schemat testu rozpoznawania nowego obiektu [na podstawie [7] w modyfikacji autorki].

Bibliografia:

1. Bitanihirwe BK, Woo TU. (2011). Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 878-893
2. Bjorkholm C, Monteggia LM. (2015). BDNF- a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*, 102: 72-9
3. Cabungcal JH, Nicolas D, Kraftsik R, Cuenod M, Do KQ, Hornung J-P. (2006). Glutathione deficiency during development induces anomalies in the rat anterior cingulate GABAergic neurons: relevance to schizophrenia. *Neurobiol Dis*, 22: 624-637
4. Castagne V, Cuenod M, Do KQ. (2004). An animal model with relevance to schizophrenia: sex-dependent cognitive deficits in Osteogenic Disorder-Shionogi rats induced by glutathione synthesis and dopamine uptake inhibition during development. *Neuroscience*, 123: 821-834
5. Conley RR, Ascher-Svanum H, Zhu B, Faries DE, Kinon BJ. (2007). The burden depressive symptoms in the long-term treatment of patients with schizophrenia. *Schizophr Res*, 90: 186-197
6. Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lsuer CJ. (2000). Schizophrenia: glutathione deficiency in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci*, 12: 3721-3728
7. Dong-Hee K, Yoon-Sun J, Won KJ, Jung-Soo H. (2019). Assessment of cognitive phenotyping in inbred, genetically modified mice, and transgenic mouse models of Alzheimer's Disease. *Experimental Neurobiology*, 28: 146-157
8. Goldner EM, Hsu L, Waraich P, Somers JM. (2002). Prevalence and incidence studies of schizophrenic disorders: a systematic review of the literature. *Can J Psychiatry*, 47: 833-843
9. Hereta M, Kamińska K, Białoń M, Wąsik A, Lorenc-Koci E, Rogóż Z. (2020). Effect of combined treatment with aripiprazole and antidepressants on the MK-801-induced deficits in recognition memory in novel recognition test and on the release of monoamines in the rat frontal cortex. *Behavioral Brain Research*, 1; 393: 112769
10. Hereta M, Kamińska K, Rogóż Z. (2019). Co-treatment with antidepressants and aripiprazole reversed the MK-801-induced some negative symptoms of schizophrenia in rats. *Pharmacological Reports*, 71: 768-773
11. Hiroshi K, Satoshi I, Miki Y, Natsuko I, Sea M, Eri F, Riho H, Kohei I, Toshio H. (2017). Early deprivation increase high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open fields test in rats. *Neuroscience Research*, 123: 27-35
12. Lewis DA, Lieberman JA. (2000). Caching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*, 28: 325-334
13. Lorenc-Koci E. (2015). Dysregulation of glutathione synthesis in psychiatric disorders. In: *Studies on psychiatric disorders. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice*. Eds. Dietrich-Muszalska A, Chauhan V, Grignan S, Humana Press, pp.269-299
14. Rogóż Z. (2013). Combined treatment with atypical antipsychotics and antidepressants in treatment-resistant depression: preclinical and clinical efficacy. *Pharmacological Reports*, 65: 1535-44
15. Tamminga CA, Holcomb HH. (2005). Phenotype of schizophrenia: A review and formulation. *Mol Psychiatry*, 10: 27-39
16. van Os, Rutten BP, Poulton R. (2008). Gene-environment interaction in schizophrenia: Review of epidemiological findings and future directions. *Schizophr Bull*, 34: 1066-1082
17. Yasuyuki H, Iain MT, Maiko K. (2018). Testing Animal Anxiety in Rats: Effects of Open Arm Ledges and Closed Arm Wall Transparency in Elevated Plus Maze Test. *Journal of Visualized Experiments*, 136: 56428