KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 69 2020
Numer 1 (326)
Strony 185–200

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

EWA BĄCZYŃSKA, ADAM KRZYSTYNIAK, MONIKA ZARĘBA-KOZIOŁ, IZABELA FIGIEL, JAKUB WŁODARCZYK, TOMASZ WÓJTOWICZ

Pracownia Biofizyki Komórki
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: j.wlodarczyk@nencki.edu.pl
t.wojtowicz@nencki.edu.pl

NOWOCZESNE TECHNIKI WYKORZYSTYWANE DO BADAŃ EKSPERYMENTALNYCH ZABURZONEJ PLASTYCZNOŚCI NEURONALNEJ W DEPRESJI*

PLASTYCZNOŚĆ NEURONALNA W DEPRESJI

Depresja należy do najczęstszych chorób psychicznych na świecie. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) na depresję cierpi obecnie ok. 322 mln osób, w tym 34 mln w Europie i 1,5-3 mln w Polsce (DRAPAŁA 2014, WHO 2017). Raport WHO z 2017 r. wskazuje, że choroba ta jest główną przyczyną niezdolności ludzi do pracy. Co więcej, szacuje się, że w 2030 r. depresja będzie najbardziej rozpowszechnionym globalnie problemem zdrowotnym. W leczeniu depresji stosuje się psychoterapię w połączeniu z farmakoterapią. Niestety ponad połowa pacjentów jest oporna na standardowe leczenie. Wiadomo, że depresja jest chorobą, w której obserwuje się zmiany na wielu poziomach funkcjonowania organizmu, począwszy od ekspresji genów i budowy jądra komórkowego, przez zaburzenia struktur komórkowych przekładające się na nieprawidłową aktywność elektryczną komórek nerwowych, w konsekwencji prowadzące do zmian w zachowaniu (MALHI i MANN 2018).

Jedną z podstawowych właściwości mózgu jest zdolność do przetwarzania i przechowywania informacji w zorganizowanych sieciach neuronalnych, które mogą ulegać modyfikacji w odpowiedzi na bodźce. Zjawisko to nosi nazwę plastyczności neuronalnej. Bodźce awersyjne, takie jak stres czy ból, pojawiające się chronicznie, mogą wywoływać epizod depresyjny, który na poziomie komórkowym objawia się zaburzoną plastycznością neuronalną. O nieprawidłowościach w plastyczności neuronalnej u chorych na depresję świadczą wyniki badań prowadzonych za pomocą testów neuropsychologicznych i technik neuroobrazowania. W trakcie epizodu depresyjnego obserwuje się zaburzenia pamięci operacyjnej i funkcji wykonawczych związanych z dysfunkcją kory przedczołowej, hipokampa oraz ciała migdałowatego, czyli struktur mózgu szczególnie wrażliwych na wpływ chronicznego stresu (KRAUS i współaut. 2019).

Towarzysząca depresji zaburzona plastyczność neuronalna została najlepiej scharakteryzowana w hipokampie. Dzięki licznym połączeniom z pozostałymi strukturami, składającymi się na układ limbiczny, oraz dużej wrażliwości na hormony stresu, hipokamp wydaje się odgrywać szczególną rolę w patogenezie depresji. Upośledzenie funkcji hipokampa odbywa się na wielu płaszczyznach: od zmniejszenia liczby rozgałęzień wypustek neuronalnych (dendrytów) i gęstości kolców dendrytycznych, stanowiących część postsynaptyczną synaps pobudzających, po ograniczenie neurogenezy (CONRAD i współaut. 2017). Kora przedczołowa, odpowiadająca za regulację motywacji, uwagi i negatywnych emocji, również wykazuje atrofię dendrytów, co bezpośrednio wiąże się

Słowa kluczowe: depresja, plastyczność neuronalna, plastyczność strukturalna, kolce dendrytyczne, synapsa

*Autorzy niniejszego artykułu E.B, A.K., M. Z-K., J.W i T.W. dziękują Narodowemu Centrum Nauki za wsparcie finansowe (projekt nr 2017/26/E/NZ4/00637). Izabela Figiel dziękuje za wsparcie Narodowemu Centrum Nauki (projekt nr 2015/19/B/NZ3/01376). Ewa Bączyńska dziękuje za wsparcie Narodowemu Centrum Nauki (projekt nr UMO-2017/27/N/NZ3/02417).

z obniżoną motywacją do działania czy zaburzoną koncentracją. Co ciekawe, w przeciwieństwie do hipokampa i kory przedczołowej, neurony ciała migdałowatego reagują zwiększeniem plastyczności neuronalnej, co związane jest ze wzmożoną lękliwością, którą obserwuje się zarówno u pacjentów cierpiących na depresję, jak i w zwierzęcych modelach depresji. Zaburzenia plastyczności neuronalnej w układzie nagrody są również ściśle związane z charakterystyczną dla depresji niezdolnością do odczuwania przyjemności - anhedonią.

Depresja to choroba wieloczynnikowa, często nawracająca i rozwijająca się w długim czasie, dlatego przyjmuje się, że musi być związana z trwałymi zmianami w architekturze i funkcjonowaniu centralnego układu nerwowego (DUMAN i współaut. 2016). W niniejszym artykule przedstawiamy wybrane, doświadczalne modele biologiczne oraz nowoczesne techniki, dzięki którym neurobiolodzy próbują poznać mechanizmy leżące u podstaw depresji, co jest niezbędne w tworzeniu skutecznych farmakoterapii.

KRYTERIA MODELOWANIA DEPRESJI U ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH

Z powodu braku uznanych, specyficznych markerów depresji, stosuje się kryteria diagnostyczne dotyczące zaburzeń emocjonalno-poznawczych, zawarte w Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-10. Zgodnie z wytycznymi epizod depresyjny to utrzymujący się przez minimum 2 tygodnie zestaw przynajmniej dwóch z trzech objawów: obniżenie nastroju, anhedonia (niezdolność do odczuwania przyjemności i radości z czynności, które normalnie tę przyjemność wywoływały), obniżenie aktywności ruchowej, oraz przynajmniej dwóch z siedmiu objawów dotyczących: zaburzeń koncentracji, obniżenia samooceny, bezpodstawnego poczucia winy, występowania pesymistycznych myśli, ideacji samobójczych, zaburzeń snu czy apetytu (WHO 1993). Problemem w badaniach komórkowych mechanizmów depresji jest ograniczony dostęp to tkanki nerwowej pacjentów. Ingerencja chirurgiczna w celu pobrania tkanki do badań jest najczęściej niemożliwa (poza bardzo wyjątkowymi sytuacjami takimi jak neurochirurgiczne usuwanie ognisk epilepsji czy zmian nowotworowych lub pobranie tkanki *post mortem*). Zaś modelowanie depresji u zwierząt jest ograniczone przez wyjątkowo złożoną naturę tej choroby. Po pierwsze, zaburzeniom depresyjnym u ludzi mogą towarzyszyć inne choroby psychiatryczne, takie jak schizofrenia, alkoholizm, zaburzenia lękowe czy choroba dwubiegunowa. Po drugie, depresja może mieć różną etiologię; poza czynnikami stresogennymi zachowania depresyjne mogą być wywołane zaburzeniami w gospodarce hormonalnej, podwyższonym poziomem cytokin prozapalnych lub mieć podłoże jatrogenne. Po trzecie, podatność na depresję jest w istotny sposób uwarunkowana genetycznie (DUMAN i współaut. 2016, KRAUS i współaut. 2019, MALHI i MANN 2018). Doskonały model zwierzęcy powinien reprezentować objawy depresji podobne do tych obserwowanych u ludzi. Poza zmianami w zachowaniu, powinien również reprezentować zmiany anatomiczne, neuromorfologiczne i biochemiczne. Taki model powinien wykazywać się tą samą etiologią, czyli pojawiające się objawy powinny być wywoływane przez te same lub podobne czynniki, co dolegliwości obserwowane u ludzi. Wreszcie, doskonały model powinien reagować na znane czynniki terapeutyczne podobnie jak ludzie. Niestety, z powodu wielkiej zmienności zachowań obserwowanych u ludzi, nie istnieją doskonałe modele chorób psychiatrycznych, a istniejące skupiają się głównie na modelowaniu zaledwie pewnych aspektów tych chorób. Nieliczne modele *in vitro*, w szczególności hodowle organoidów uzyskiwane z indukowanych komórek macierzystych, mogą w przyszłości pozwolić na zrozumienie niektórych aspektów molekularnych i komórkowych depresji (WANG 2018).

ZWIERZĘCE MODELE DEPRESJI

Obecnie najczęściej stosowane eksperymentalne modele depresji oparte są na ekspozycji zwierząt na czynniki stresowe, które indukują naturalne mechanizmy prowadzące do powstawania objawów depresji. Jednym z powszechnie stosowanych modeli chronicznego stresu jest stres unieruchomienia. Ze względu na prawdopodobieństwo pojawienia się habituacji do unieruchomienia model ten ma jednak ograniczone zastosowanie. Z kolei w modelu stresu socjalnego prowadzi się długotrwałą ekspozycję myszy na stres wynikający z obecności dominującego osobnika. Procedura ta trwa ok. 2 tygodni i jest powszechnie stosowana ze względu na liczne podobieństwa do depresji występującej u ludzi. Model ten do niedawna ograniczony był do badania dorosłych osobników płci męskiej, a obecnie wykorzystywany jest w badaniach myszy obu płci. W paradygmacie nieprzewidywalnego chronicznego stresu zwierzęta wystawiane są na różne rodzaje stresorów wybrane w sposób losowy, co wyklucza ryzyko habituacji. Modele te pozwalają również na uzyskanie wysokiego stopnia podobieństwa do depresji występującej u ludzi, ponieważ doprowadzają do

pojawienia się zwierząt podatnych (depresyjnych) i odpornych na depresję, pomimo ekspozycji na te same bodźce. Dla badaczy jest to niezwykle ciekawe, ponieważ umożliwia wgląd w endogenne mechanizmy zabezpieczające przed depresją (KRZYSTYNIAK i współaut. 2019). Z kolei w celu odwzorowania zwiększonej podatności na depresję u osób, które we wczesnym dzieciństwie były poddane traumatycznym przeżyciom, stosuje się model wczesnego stresu postnatalnego, w którym dokonuje się fizycznej separacji młodych myszy od matki na dłuższe odstępy czasu (1-24h) w ciągu pierwszych dwu tygodni życia. Jednak ze względu na ryzyko wywołania zmian metabolicznych u osesków mysich, w czasie odstawienia od matki ostatnio wykorzystuje się alternatywne podejście, polegające na podawaniu samicy małej ilości materiału gniazdowego. Następstwem chaotycznej i niepełnej opieki nad młodymi osobnikami są objawy przypominające depresję w ich późniejszym dojrzałym życiu (WANG i współaut. 2017, GURURAJAN i współaut. 2019).

Poza wyżej wymienionymi modelami behawioralnymi depresji, stosuje się również model farmakologiczny, w którym zaburza się funkcjonowanie osi przysadka-podwzgórze-kora nadnerczy (ang. HPA) przez chroniczne podawanie hormonu stresu-kortykosteronu. Jednak model ten obarczony jest ograniczonym podobieństwem do zaburzeń obserwowanych u ludzi. Dodatkowo, zwiększony metabolizm wątrobowy egzogennie podawanego kortykosteronu oraz zależna od płci wrażliwość na wysoki poziom hormonów kory nadnerczy, nastręcza wiele problemów w interpretacji uzyskiwanych wyników. Część pacjentów chorych na depresję skarży się na częściową bądź całkowitą utratę węchu w trakcie epizodów depresyjnych. Dlatego jednym z modeli badania mechanizmów depresji jest chirurgiczne usunięcie opuszek węchowych u gryzoni, co prowadzi do powstawania zachowań depresyjnych. Od lat 90. XX w., kiedy wykazano bezpośredni związek między depresją a podwyższonym poziomem stanu zapalnego, pojawiły się również modele, w których wykorzystuje się czynniki indukujące stan zapalny lub mediatory tego stanu (np. bakteryjny lipopolisacharyd). Mimo iż uzyskany w ten sposób stan zapalny jest dużo silniejszy niż ten obserwowany u ludzi chorych na depresję, to wywołuje zbliżone objawy i odpowiedź na czynniki przeciwdepresyjne (WANG i współaut. 2017, GURURAJAN i współaut. 2019).

Zaawansowane badania nad ludzkim genomem doprowadziły do identyfikacji genów kodujących białka potencjalnie odpowiedzialne za predyspozycje do depresji. Manipulacja odpowiednikami tych genów u myszy przyniosła interesujące rezultaty. Na przykład osobniki pozbawione funkcjonalnych receptorów lub transporterów monoamin (serotoniny, dopaminy, noradrenaliny), mózgowego czynnika neurotroficznego (BDNF) oraz jego receptora (TrkB), czy elementów szlaku HPA częściej zapadają na depresję (PERONA i współaut. 2008, PHILLIPS 2017). Dzięki nowoczesnej technologii edycji genów, tworzenie zwierząt transgenicznych przyczyniających się do postępu w badaniach nad patogenezą depresji stało się prostsze i z pewnością będzie coraz częściej stosowane.

TESTY WYKORZYSTYWANE DO BADANIA ZACHOWAŃ DEPRESYJNYCH U MYSZY

W mysich modelach depresji zazwyczaj stosowane są testy, za pomocą których określa się następujące parametry zachowań depresyjnych: deficyty hedoniczne, obniżenie motywacji, podniesiony poziom lękliwości, zaburzenia pamięci i koncentracji, zaburzone interakcje socjalne, zaburzenia snu i utratę wagi. Przyjmując objawy depresji jako wyznacznik, sklasyfikowaliśmy i opisaliśmy poniżej najczęściej wykorzystywane testy behawioralne definiujące zachowania depresyjne u zwierząt laboratoryjnych.

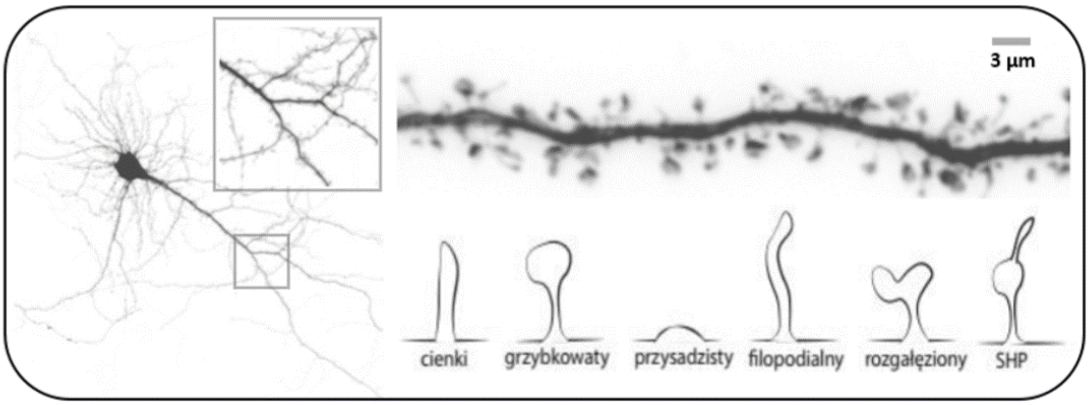
Deficyty hedoniczne można badać testem preferencji sacharozy, w którym zwierzę ma jednoczesny dostęp do wody i roztworu sacharozy. Wynik tego testu może być wyrażony w ilości wypitego roztworu cukru, w stosunku do sumy ilości wypitych płynów, lub stosunku do masy ciała. Obniżona preferencja sacharozy definiuje anhedonię u zwierząt (LIU i współaut. 2018). W różnych modelach depresji test ten okazał się wyznacznikiem zaburzeń w działaniu układu nagrody. Zamiennie stosowane testy to: test zapachu uryny samicy, test warunkowej preferencji miejsca czy samostymulacja wewnątrzczaszkowa. Z kolei w celu badania motywacji wykorzystuje się test wymuszonego pływania lub test podwieszenia za ogon. Oba testy oparte są na naturalnej tendencji myszy do zamierania po zakończeniu nieudanych prób ucieczki w stresującej sytuacji, jaką jest umieszczenie zwierzęcia w cylindrze z wodą lub zawieszenie za ogon. Wydłużony czas bezruchu określany jest jako zachowanie depresyjne i pozwala na ocenę skuteczności działania potencjalnych terapeutyków, podawanych zwierzętom przed badaniem. Metodą weryfikacji poziomu lękliwości u myszy jest test otwartego pola, oparty na naturalnej dla gryzoni skłonności do eksplorowania nieznanych przestrzeni i unikania jasno oświetlo-

nych miejsc. W teście tym mysz umieszczana jest w otwartym pudełku, którego środek jest oświetlony. Wydłużony czas przebywania zwierzęcia przy zacienionych ściankach pudełka określa zwiększony poziom lęku. Test ten, ze względu na prostotę wykonania, jest bardzo powszechnie wykorzystywany. Innymi testami w tej kategorii pozostają: test uniesionego labiryntu krzyżowego, test jasnego i ciemnego pola czy ograniczenie żerowania wywołane nowymi bodźcami. Do badań procesów uczenia i pamięci powszechnie stosuje się test rozpoznawania nowego obiektu, w którym wykorzystuje się tendencję gryzoni do eksplorowania nowego miejsca lub nieznanych przedmiotów. W teście rozpoznawania zwierzęciu prezentowane są dwa identyczne obiekty, które mysz ma okazję dowolnie eksplorować, a następnie po określonym czasie jeden z obiektów zamieniany jest na nowy. Zwierzęta z zaburzeniami pamięci lub koncentracji, w odróżnieniu od zwierząt kontrolnych, spędzają tyle samo czasu przy nowym i znanym obiekcie. Podobnie jak u ludzi, u myszy można obserwować i wyrażać ilościowo zaburzenia interakcji socjalnych, zaburzenia snu czy zmiany wagi ciała. Na przykład test unikania interakcji socjalnych polega na pozostawieniu myszy wyboru przebywania w samotności lub w kompartymencie, w którym znajduje się inna mysz. W modelu depresji obserwuje się skrócenie czasu przebywania zwierzęcia w towarzystwie drugiego osobnika (WANG i współaut. 2017, GURURAJAN i współaut. 2019). Z kolei zaburzenia snu można wyrazić ilościowo przez pomiar czasu aktywności zwierzęcia w trakcie doby. Warto pokreślić, że potwierdzenie występowania zachowań depresyjnych powinno wiązać się z pozytywnym wynikiem uzyskanym w więcej niż jednym z wymienionych wyżej testów (LEZAK i współaut. 2017, GURURAJAN i współaut. 2019). Po dokonaniu behawioralnej charakterystyki zwierzęcego modelu depresji możliwe jest przystąpienie do badań molekularnych i komórkowych mechanizmów tej choroby. Poniżej przedstawiono wybrane aspekty badań tkanki nerwowej zwierząt, u których testy behawioralne potwierdziły występowanie zachowań depresyjnych.

PLASTYCZNOŚĆ STRUKTURALNA KOLCÓW DENDRYTYCZNYCH

Kolce dendrytyczne to wypustki dendrytów, które tworzą postsynaptyczną część większości synaps pobudzających w mózgu. Trójwymiarowa rekonstrukcja kolców dendrytycznych pozwala na uwidocznienie odchodzącej od dendrytu cienkiej szyjki zakończonej szerszą główką. Taka budowa kolców dendrytycznych umożliwia zachodzenie niezależnych procesów biochemicznych i elektrycznych, zarówno w poszczególnych kompartymentach kolca, jak i w synapsach. Jedną z najbardziej charakterystycznych cech kolców dendrytycznych jest ich różnorodność morfologiczna (Ryc. 1). Najpowszechniej stosowana nomenklatura opiera się na porównaniu względem siebie rozmiarów główki i szyjki kolca. W ten sposób wyróżnia się kolce cienkie (ang. thin spines), grzybkowate (ang. mushroom spines) i przysadziste (ang. stubby spines). Kolce cienkie, określane „niedojrzałymi", charakteryzują się małą główką i wąską szyjką. Zazwyczaj są znacznie dłuższe niż pozostałe typy kolców. Kolce grzybkowate, opisywane jako „dojrzałe", cechują się dużą główką i wyraźnie cieńszą szyjką. Z kolei kolce przysadziste są bardzo krótkie i trudno u nich wyróżnić szyjkę (BOURNE i HARRIS 2008, BAILEY i współaut. 2015, CHIDAMBARAM i współaut. 2019).

Kształt i liczba kolców dendrytycznych podlegają dynamicznym zmianom. Nowo utworzone dendryty nie posiadają na swojej



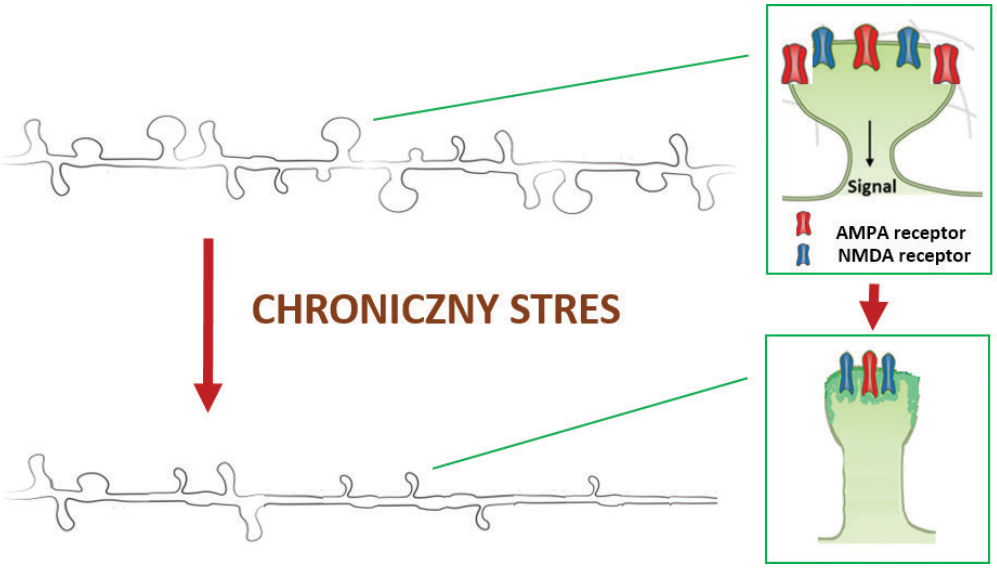
Ryc. 1. Schemat przedstawiający różnorodność kształtu kolców dendrytycznych.

powierzchni kolców. Dopiero w trakcie dalszych etapów dojrzewania neuronu formują się kolce dendrytyczne, na których następnie powstają synapsy. Początkowo kolce są długie i cienkie, natomiast w miarę postępu procesu synaptogenezy, w wyniku tworzenia stabilnych połączeń synaptycznych, wydłużone kolce dojrzewają i stają się grzybkowate. Młode osobniki charakteryzują się zwiększoną dynamiką kolców w porównaniu do osobników dorosłych, co bezpośrednio związane jest ze specjalizacją istniejących połączeń synaptycznych i eliminacją niepotrzebnych połączeń (Bourne i Harris 2008, Bailey i współaut. 2015, Chidambaram i współaut. 2019).

Kolce dendrytyczne mogą zmieniać swój kształt spontanicznie lub w odpowiedzi na stymulację. Interesującym przykładem tego zjawiska jest pojawianie się długiej cienkiej wypustki na powierzchni główki kolca dendrytycznego (ang. spine head protrusion, SHP) w komórkowym modelu uczenia, w którym chemicznie indukowany jest wzrost aktywności sieci neuronalnej. Chociaż funkcja SHP jest wciąż nieznana przypuszcza się, że ich obecność związana jest z procesami przebudowy struktury kolców i z tworzeniem nowych śladów pamięciowych.

Główną funkcją kolców dendrytycznych jest przewodnictwo synaptyczne i kompartymentalizacja cząsteczek sygnalnych. Jak wspomniano wyżej, kolce z większą główką są bardziej stabilne i tworzą bardziej trwałe połączenia synaptyczne. Powiększanie główki kolca może być związane ze wzrostem liczby receptorów dla głównego neuroprzekaźnika pobudzającego w mózgu, glutaminianu, w błonie postsynaptycznej. Są to m.in. receptory NMDA i AMPA, które odgrywają szczególną rolę w transmisji synaptycznej i długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym (ang. long-term potentiation, LTP). Co ciekawe, wielkość kolca dendrytycznego koreluje również z liczbą pęcherzyków zawierających neuroprzekaźnik uwalniany z części presynaptycznej synapsy. Z kolei długość i szerokość szyjki moduluje dyfuzję jonów wapnia, regulując tym samym wydajność synapsy. Przyjmuje się, że nowo powstające kolce, najczęściej z wąską główką, odpowiadają za przyswajanie nowych informacji, natomiast kolce stabilne, z szerszą główką, służą do długotrwałego przechowywania śladów pamięciowych (Bourne i Harris 2008, Bailey i współaut. 2015, Chidambaram i współaut. 2019).

W zwierzęcych modelach depresji obserwuje się spadek gęstości kolców dendrytycznych i wydłużanie pozostałych kolców, co bezpośrednio związane jest z upośledzonym neuroprzekaźnictwem glutaminianergicznym (Ryc. 2) i zaburzeniem funkcji kognitywnych (Banasr i współaut. 2011). Pod wpływem przewlekłego stresu neurony hipokampa, kory przedczołowej i ciała migdałowatego nieprawidłowo przebudowują sieć połączeń synaptycznych objawiając tzw. plastyczność patologiczną. Podobnie pacjenci z depresją wykazują zredukowaną objętość hipokampa, co bezpośrednio związane jest ze zmniejszonym stopniem rozgałęzienia drzewek dendrytycznych i redukcją liczby kolców. Tymczasem komórki ciała migdałowatego i jądra półleżącego wykazują wzrost gęstości kolców, co może być związane z kompensowaniem utraty funkcji neuronów w hipokampie (Lai i Ip 2013, Qiao i współaut. 2016). W związ-



Ryc. 2. Schemat przedstawiający dynamikę kolców dendrytycznych wywołaną chronicznym stresem.

ku z powyższym, nieprawidłowości w budowie i gęstości kolców dendrytycznych są doskonałymi wyznacznikami zmian strukturalnych leżących u podstaw depresji. Podejścia terapeutyczne, mające na celu przywrócenie utraty gęstości kolców i prawidłowej plastyczności neuronalnej w hipokampie, mogą okazać się przełomowe w opracowaniu skutecznej farmakoterapii.

METODY WIZUALIZACJI DYNAMIKI KOLCÓW DENDRYTYCZNYCH

Dokładna charakterystyka kolców dendrytycznych jest niezbędna do zrozumienia ich roli w rozwoju sieci neuronalnej towarzyszącej fizjologicznej aktywności synaptycznej, jak i stanom patologicznym. Badania kolców dendrytycznych utrudnia fakt, że struktury te są niewielkie, często o rozmiarach będących na granicy zdolności rozdzielczej mikroskopii świetlnej (0,5-1 μm). Najczęściej stosowanymi metodami eksperymentalnymi służącymi do wizualizacji kolców jest pośmiertne barwienie tkanek mózgu (immunohistochemiczne lub metodą Golgiego). Główną zaletą tych metod jest uzyskiwanie wyraźnego obrazu (wysoki kontrast), ale jednocześnie poważną wadą jest ograniczona możliwość określenia typów wybarwionych neuronów. Ponadto, metody te znajdują swoje zastosowanie wyłącznie w odniesieniu do utrwalonej tkanki i nie można ich stosować do wizualizacji żywych komórek. Jednak ciągły postęp technologiczny w mikroskopii, biologii molekularnej oraz inżynierii białek i inżynierii genetycznej sprawił, że obrazowanie dynamiki kolców dendrytycznych w żywym mózgu stało się realne. Wiele zaawansowanych technik mikroskopii fluorescencyjnej, takich jak: konfokalna mikroskopia skaningowa, mikroskopia dwufotonowa czy mikroskopia super-rozdzielcza, pokonując ograniczenie dyfrakcyjne, umożliwia obrazowanie struktury kolców dendrytycznych na wcześniej nie osiągalnym poziomie (CHIDAMBARAM i współaut. 2019).

Opracowanie i doskonalenie metod barwienia fluorescencyjnego z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych barwników znakujących, przeciwciał powiązanych z fluorochromem, a także wprowadzanie do żywych komórek genetycznie kodowanych białek fluorescencyjnych (np. białko zielonej fluorescencji, GFP) pozwala na szczegółową identyfikację znakowanych neuronów. Następujące później obrazowanie wyznakowanych komórek jest wykonywane za pomocą mikroskopii konfokalnej, a uzyskane obrazy są poddawane dalszej analizie.

Stosowanie różnorodnych technik wizualizacji kolców czy modeli eksperymentalnych wymaga wykorzystania zunifikowanych narzędzi pozwalających na rzetelną analizę morfometryczną. Ostatnio opracowano szereg wyspecjalizowanych programów komputerowych umożliwiających zarówno półautomatyczną dwuwymiarową analizę morfologii (Spine Magick, 2dSpAn), gęstości (2dSpAn-AUTO), jak i półautomatyczną trójwymiarową analizę wybranych segmentów dendrytów. Programy te dają możliwość obiektywnej oceny zmian strukturalnych, niezależnie od stosowanych modeli eksperymentalnych czy sposobu wizualizacji kolców (BASU i współaut. 2016, 2018).

W badaniach dynamiki kolców dendrytycznych, towarzyszącej różnym chorobom mózgu, znalazły również zastosowanie: nowoczesne metody inżynierii genetycznej (CHIDAMBARAM i współaut. 2019). Technologia rekombinacji umożliwia genetyczne modyfikowanie m.in. szczepów wirusowych w celu wykorzystania ich jako narzędzi do mapowania i śledzenia wybranych ścieżek neuronalnych. Wektory wirusowe zwykle łatwo infekują komórki nerwowe i rozprzestrzeniając się w nich stanowią doskonałe narzędzie do precyzyjnego mapowania połączeń synaptycznych określonej populacji neuronów. Z kolei technologia optogenetyczna, będąca połączeniem inżynierii genetycznej i technik optycznych, pozwala na śledzenie aktywności synaptycznej w żywych organizmach. Podstawą tego podejścia jest wprowadzenie do komórki nerwowej genów kodujących białka kanałów jonowych (np. kanałorodopsyny czy halopsyny), które wbudowują się w błonę neuronu i aktywowane światłem umożliwiają przepływ jonów. W ten sposób naświetlając tkankę nerwową falą elektromagnetyczną określonej długości możliwe jest uzyskanie depolaryzacji lub hiperpolaryzacji błony neuronu i w konsekwencji zwiększenie lub zmniejszenie jego aktywności.

PLASTYCZNOŚĆ FUNKCJONALNA NEURONÓW NA PRZYKŁADZIE SYNAPS POBUDZAJĄCYCH

Zmiany strukturalne w neuronach opisane wyżej, wiążą się nieodłącznie ze zmianami funkcjonalnymi w synapsach, pobudliwości neuronów i przekazywania informacji w sieciach neuronalnych. Z badań eksperymentalnych wiadomo, że synapsy dynamicznie reagują na zmiany aktywności neuronów pre- i postsynaptycznego, wzór czasowy aktywności neuronu presynaptycznego (częstotliwość jego wyładowań) oraz że kolejność wyładowań neuronów pre- i postsynaptycznego ma wpływ na zmianę wydajności synaps.

Mechanizm plastyczności synaps ośrodkowego układu nerwowego został najlepiej

poznany na przykładzie synaps pobudzających (CITRI i MALENKA 2008). Potencjał czynnościowy docierający aksonem do zakończenia presynaptycznego, wywołuje aktywację białek napięciowo-zależnych, napływ jonów wapniowych ze środowiska zewnątrzkomórkowego do wnętrza kolbki synaptycznej i egzocytozę pęcherzyków zawierających neurotransmiter. Kiedy aktywność komórki presynaptycznej chwilowo ulega zwiększeniu (np. wskutek sumowania się kilku bodźców w czasie w skali dziesiątek lub setek milisekund), może dojść do kumulacji jonów wapniowych w części presynaptycznej i zwiększenia wydzielania neurotransmitera w synapsie. W ten sposób wydajność transmisji synaptycznej w odpowiedzi na zwiększoną aktywność neuronu presynaptycznego zwiększa się, a bodziec z podprogowego staje się bodźcem ponadprogowym. Z drugiej strony, kiedy aktywność neuronu presynaptycznego zmienia się w dłuższej perspektywie czasu (sekundy, minuty), zwiększona transmisja synaptyczna prowadzi do napływu jonów wapniowych również do części postsynaptycznej przez wyspecjalizowane białka-kanały wapniowe, takie jak receptor dla glutaminianu typu NMDA. Tam, jako przekaźnik II rzędu, jony wapniowe mogą uruchamiać szereg procesów, takich jak: fosforylacja, aktywacja białek G, dalsze uwalnianie jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych, czy w końcu, transkrypcja genów i translacja nowych białek. Te wszystkie procesy mogą długoterminowo (minuty, godziny, dni) wpłynąć na wydajność działania synapsy. W ten sposób powstają m.in. ślady pamięciowe.

Co jednak dzieje się, kiedy neuron postsynaptyczny (POST) jest już pobudzony w wyniku aktywności innych synaps? Jak w takiej sytuacji aktywność presynaptyczna (PRE) wpływa na wagę synapsy? Kiedy zbadano to zagadnienie eksperymentalnie odkryto, że w tym przypadku obowiązują inne zasady. Może np. nastąpić wzrost wydajności synapsy, kiedy aktywność o kierunku z części presynaptycznej do postsynaptycznej (PRE-POST) odbywa się sekwencyjnie w wąskim oknie czasowym (kilku do stu milisekund). Jeżeli jednak aktywność będzie POST-PRE, w tym samym oknie czasowym, może dojść do długoterminowego osłabienia transmisji synaptycznej (MARKRAM i współaut. 2012). Warto podkreślić, że wzmożonej aktywności neuronów, poza egzocytozą neuroprzekaźnika w synapsie, często towarzyszy wydzielanie dodatkowych czynników, np.: neutrofin, endokanabinoidów, tlenku azotu, które mogą w istotny sposób wpływać na zmiany wydajności synapsy w perspektywie krótko- i długoterminowej. Co istotne, jedna synapsa nie decyduje o pobudzeniu neuronu postsynaptycznego. To wynik integracji aktywności wszystkich synaps pobudzających, hamujących i modulujących determinuje, czy neuron postsynaptyczny przekazuje sygnał dalej w sieci neuronalnej. Stosując różnorodne modele eksperymentalne *in vivo, ex vivo* oraz *in vitro* możliwe jest porównanie zjawisk zachodzących w tkance osobników zdrowych i z depresją, jak również badanie wpływu wybranych związków farmakologicznych na zjawisko plastyczności synaptycznej.

Stres i związana z tym wzmożona aktywacja receptorów glikokortykoidów zmienia wydzielanie glutaminianu w wielu regionach mózgu. Co więcej, stres może upośledzać długotrwałe wzmocnienie synaptyczne w hipokampie i korze przedczołowej, a pogłębiać długotrwałe osłabienie synaptyczne. Obserwuje się również obniżenie ekspresji błonowych białek receptorowych dla glutaminianu (np. receptorów typu AMPA i NMDA) oraz białek tworzących rusztowanie synapsy, co prowadzi do zmniejszenia wydajności transmisji synaptycznej. Co ważne, szlaki wewnątrzkomórkowe, których aktywacja jest niezbędna do długoterminowej zmiany w depresji, operują inaczej. Obserwuje się spadek aktywności kinaz (PKA, ERK, Akt, GSK-3β), syntazy tlenku azotu czy czynników transkrypcyjnych (np. CREB). Efekty te są częściowo odwracalne przez zastosowanie antydepresantów (DUMAN i współaut. 2016). Niektóre z nich, o relatywnie szybkim działaniu (godziny, dni) to blokery lub negatywne allosteryczne modulatory kanału typu NMDA (ketamina, lanicemina, CP 101,606, GLYX-13) albo antagoniści receptora acetylocholiny (skopolamina). W przywracaniu równowagi w działaniu neurotransmitera glutaminianu znajduje zastosowanie tianeptyna. Natomiast terapia elektrowstrząsowa, magnetyczna stymulacja przezczaszkowa i stymulacja nerwu błędnego stosowana jest w celu podniesienia poziomu BDNF i/lub wzmocnienia plastyczności neuronalnej.

TECHNIKI ELEKTROFIZJOLOGICZNE W BADANIACH ZABURZONEJ PLASTYCZNOŚCI NEURONALNEJ W MODELU DEPRESJI

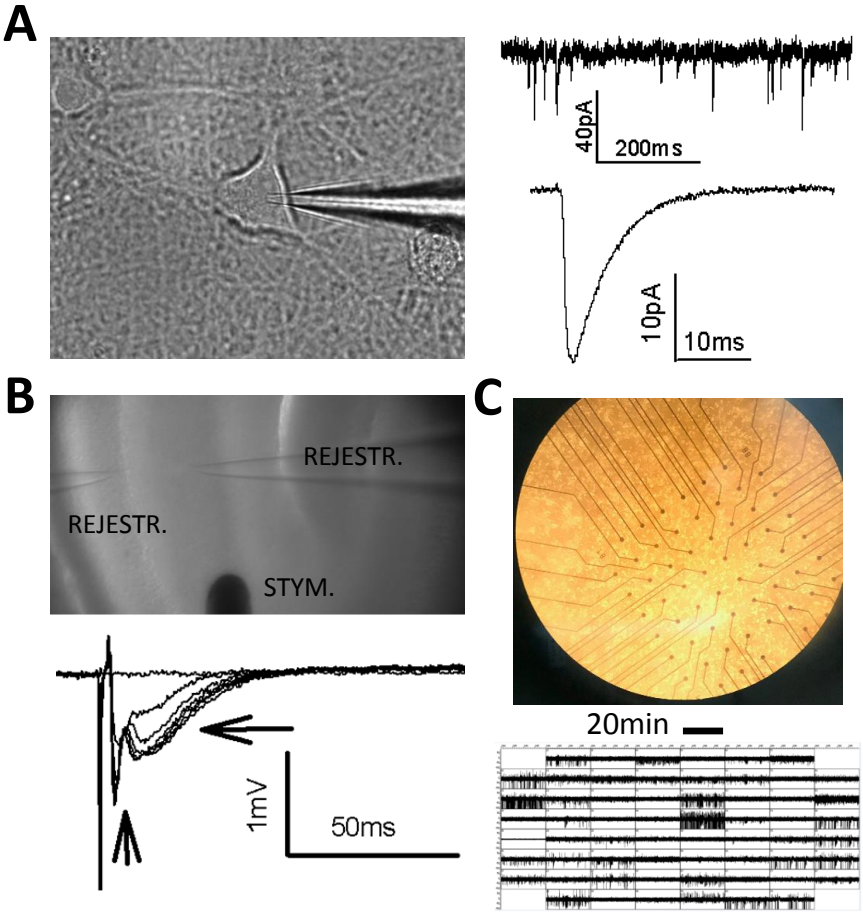
Różnorodne techniki elektrofizjologiczne umożliwiają rejestrację aktywności elektrycznej na poziomie pojedynczych białek przewodzących jony, aktywności synaps, aktywności komórek nerwowych, aż po sieci neuronalne i całe obszary ośrodkowego układu nerwowego. W badaniach elektrofizjologicznych wykorzystuje się powszechnie fakt, iż komórki pobudliwe takie jak neurony, posia-

dają w błonie komórkowej wyspecjalizowane białka umożliwiające przepływ jonów przez błonę. Białka te aktywowane są przez zmianę pola elektrycznego na błonie (białka napięciowo-zależne) lub przez związanie ligandu (zwykle neurotransmitera), zaś przepływ jonów odbywa się zgodnie z gradientem stężeń jonów w polu elektrycznym (zjawisko elektrodyfuzji). Zarówno ruch jonów to mierzalny prąd, jak również zmiana gęstości ładunku to mierzalna różnica potencjałów elektrycznych (napięcie elektryczne). Technika patch-clamp, udoskonalona przez Erwina Nehera i Berta Sakmanna w latach 70. i 80. (Nagroda Nobla 1991), jest obecnie powszechnie stosowana w badaniach patomechanizmu depresji i jest rozwinięciem techniki pomiaru przy ustalonym napięciu (ang. voltage-clamp) autorstwa Kenetha Cole (COLE 1949). Dzięki rozwojowi techniki patch-clamp możliwe jest rejestrowanie prądów od- i dokomórkowych na poziomie pojedynczych kanałów jonowych, synaps czy całych komórek nerwowych. Do tego celu wykorzystuje się pipety ze szkła o stożkowatym kształcie i średnicy końcówki około 1 μm, a więc wielokrotnie mniejszym niż ciało komórki nerwowej (Ryc. 3A). Pipeta jest wypełniana elektrolitem (roztworem elektrodowym), który umożliwia kontakt elektryczny między elektrodą pomiarową a otoczeniem. Elektroda pomiarowa rejestruje zmianę napięcia lub prądu względem elektrody odniesienia, zanurzonej w roztworze. Sygnał jest następnie wzmacniany, filtrowany i zapisywany na dysk komputera dzięki przetwornikowi analogowo-cyfrowemu. Technika patch-clamp pozwala na ustalenie stałego napięcia elektrycznego w obwodzie i obserwację prądu rejestrowanego przez elektrodę. Alternatywnie, istnieje możliwość kontrolowania prądu płynącego przez obwód i obserwacji zmian napięcia elektrycznego. Jeżeli eksperymentator utworzy wysokooporowe połączenie pipety szklanej na powierzchni błony komórkowej, wówczas możliwe jest rejestrowanie np. aktywności kanałów jonowych lub potencjałów czynnościowych w obrębie fragmentu błony pod pipetą pomiarową (o powierzchni od 1 do kilku μm^2). Zerwanie łatki błonowej, znajdującej się bezpośrednio pod końcówką pipety poprzez puls ciśnienia, pozwala na uzyskanie kontaktu elektrycznego z wnętrzem komórki nerwowej i rejestrację sygnałów elektrycznych płynących przez całą komórkę.

W centralnym układzie nerwowym ważną rolę w przewodzeniu sygnałów między neuronami odgrywa przekaźnictwo chemiczne. Szacuje się, że w synapsach chemicznych, receptory postsynaptyczne eksponowane są na wysokie stężenie neurotransmitera przez bardzo krótki czas (<1ms). Po osiągnięciu wartości maksymalnej, stężenie neurotransmitera maleje wykładniczo w czasie. Modyfikacja warunków panujących w synapsie (np. profil czasowy wydzielania neurotransmitera i jego wychwyt, czy liczba i funkcja kanałów jonowych w błonie postsynaptycznej) ma wpływ na przebieg czasowy prądu synaptycznego. W rozwiniętej sieci neuronalnej częstotliwość pojawiania się prądów synaptycznych jest zwykle tak duża, że kolejne prądy nakładają się na siebie, co uniemożliwia precyzyjną analizę kinetyczną wydarzeń synaptycznych. Jednak, gdy egzocytoza pęcherzyków synaptycznych zachodzi spontanicznie (przy braku wyładowań sieci neuronalnej), w neuronie postsynaptycznym zarejestrować można pojedyncze miniaturowe prądy postsynaptyczne, które posiadają wszystkie cechy opisanego wcześniej typowego prądu synaptycznego i są powszechnie stosowanym modelem badania transmisji synaptycznej i jej modulacji przez związki farmakologiczne, np. antydepresanty (Rys. 3A). Analiza częstotliwości tych prądów, ich amplitudy, kinetyki przyrostu i deaktywacji, pozwala ilościowo opisać tak różnorodne zagadnienia jak: liczbę synaps, liczbę kanałów jonowych w synapsie czy modyfikacje potranslacyjne białek w neuronach.

Prądy synaptyczne zawierające się w wąskiej skali czasowej (zwykle <100ms) są przykładem fazowego przejawu działania synaps chemicznych. Inną istotną formą kontroli pobudliwości komórki neuronalnej jest prąd toniczny. Otóż, poza synapsą neurotransmiter osiąga stężenie ponadtysiąckrotnie mniejsze niż w synapsie, a mimo to wystarczające do aktywacji receptorów wysokiego powinowactwa, znajdujących się w błonie dendrytów, aksonu czy ciała neuronu (FARRANT i NUSSER 2005). Choć amplituda prądu tonicznego nie jest tak duża jak synaptycznego, jego stała obecność powoduje, że tą drogą przenoszone jest dużo więcej ładunków przez błonę, co ma wpływ na jej opór i pobudliwość. W plastyczności neuronalnej, kluczową rolę odgrywają receptory NMDA. Białka te, stymulowane podczas wzmożonej aktywności synaptycznej, przewodzą jony wapniowe, które jako przekaźniki drugiego rzędu inicjują kaskady wewnątrzkomórkowe. Badania pobudzających miniaturowych prądów postsynaptycznych i prądu tonicznego umożliwiły poznanie mechanizmu działania memantyny (stosowanej w leczeniu choroby Alzheimera) i antydepresanta ketaminy. Wykazano, że choć oba związki są antagonistami receptorów dla glutaminianu typu NMDA, ketamina działa na ten receptor nawet, gdy jest on nieaktywny, zmniejsza dokomórkowy napływ jonów wapnia przez receptory NMDA w synapsie i blokuje lokalną translację bia-

łek, takich jak mózgowy czynnik wzrostu BDNF (GIDEONS i współaut. 2014). Z kolei ketamina, blokując prąd toniczny receptorów NMDA poza synapsą (zawierających głównie podjednostkę GluN2B i przewodzących istotnie więcej jonów wapnia niż receptory synaptyczne), sprzyja lokalnej translacji białka i wydajniejszej transmisji pobudzającej w neuronach piramidowych kory przedczołowej (MILLER i współaut. 2014). Jednym z najbardziej skutecznych antydepresantów w grupie inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny jest escitalopram (MONTGOMERY I MOLLER 2009). Wykorzystując technikę zewnątrzkomórkowych pomiarów aktywności czynnościowej pojedynczych neuronów i technikę patch-clamp wykazano, że escitalopram może zwiększać częstotliwość wyładowań neuronów dopaminergicznych VTA oraz amplitudę prądów receptorów typu NMDA w neuronach kory przedczołowej (SCHILSTROM i współaut. 2011). Z kolei zastosowanie techniki patch-clamp w neuronach hodowanych *in vitro* pozwoliło wykazać, iż antydepresant fluoksetyna, który również jest inhibitorem wychwytu zwrotnego serotoniny, blokuje wydajniej niż lek desipramina prądy wywołane egzogennym podaniem NMDA (SZASZ i współaut. 2007). Warto dodać, że działanie niektórych leków stosowanych klinicznie w



Ryc. 3. Wybrane metody elektrofizjologiczne stosowane w badaniach eksperymentalnych mechanizmów depresji.

A) Technika patch-clamp umożliwia pomiar prądów synaptycznych z pojedynczych komórek nerwowych. Pokazano przykładową rejestrację prądów synaptycznych przy ustalonym napięciu (-60mV; prawy panel, górny przebieg) oraz amplitudę i przebieg czasowy typowego miniaturowego postsynaptycznego prądu pobudzającego przewodzonego przez receptory AMPA (prawy panel, dolny przebieg). B) Technika potencjałów polowych umożliwia rejestrację zbiorczej aktywności neuronów i synaps przez rejestrację zmian potencjału elektrycznego w miejscu pomiaru wywołaną uśrednionym prądem jonowym. Na zdjęciu przedstawiono układ elektrod stosowany do wywoływania i rejestracji potencjałów polowych w skrawku hipokampa. Poniżej pokazano przykładową rejestrację postsynaptycznych potencjałów pobudzających wywołanych aktywnością receptorów AMPA i NMDA. Strzałki wskazują szybką i wolną komponentę sygnału (z receptorów odpowiednio AMPA i NMDA). C) Zdjęcie macierzy wieloelektrodowej (pow. 15x) i przykładowe 20-minutowe zapisy z 64 elektrod.

leczeniu epilepsji, zaburzeń lękowych bezsenności czy znieczuleniu, opiera się również na modulacji funkcji kanałów $GABA_A$ przewodzących jony chlorkowe i prąd toniczny hamujący (np.: Ganaxolone, Propofol, Tiagabine, Vigabatrin (BRICKLEY i MODY 2012).

Pod wpływem aktywności synaptycznej dochodzi do przepływu prądu przez płyn zewnątrzkomórkowy, który jest przewodnikiem elektrycznym. Płynący prąd generuje z kolei spadki potencjału w roztworze, które można rejestrować w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Napływ kationów do wnętrza neuronu podczas aktywności synaps pobudzających, tworzy na zewnątrz komórki aktywny zlew potencjału. Prąd wewnątrzkomórkowy, płynąc po linii najmniejszego oporu, zwykle opuszcza komórkę w okolicach ciała komórki, gdzie tym samym powstaje źródło prądowe, i zamyka obwód. Zatem podczas lokalnej aktywności synaps, neuron staje się dipolem elektrycznym, bowiem okolice drzewka dendrytycznego chwilowo wykazują ujemny potencjał w stosunku do ciała komórki. Gdy duża grupa neuronów skupiona jest w jednym miejscu, możliwe jest, po zastosowaniu wzmocnienia i filtrowania w zakresie 0,1-3 kHz, rejestrowanie dość znacznych (rzędu kilku miliwoltów) zmian zsumowanej różnicy potencjałów, zwanej potencjałem polowym (Ryc. 3B). Co istotne, czas trwania potencjału polowego jest wypadkową wszystkich prądów w tym miejscu i może odzwierciedlać kinetykę transmisji synaptycznej. Ponieważ potencjały polowe są wypadkową aktywności wielu neuronów i prądów jonowych o różnym ładunku i kierunku, metoda ich pomiaru pozwala w sposób pośredni, ale nie jednoznaczny, opisać aktywność wielu synaps, neuronów lub sieci neuronalnych. Połączenie stymulacji elektrycznej i farmakologii w anatomicznie zidentyfikowanym miejscu umożliwia studiowanie wybranej populacji synaps bądź neuronów. Stymulacja aksonów odpowiednio dobranym przez eksperymentatora wzorem impulsów pobudzających pozwala wywołać długotrwałą plastyczność synaptyczną. W badaniach *in vivo* niezwykle pomocna jest również technika jonoforezy, w której wykorzystuje się fakt, że wiele związków zawieszonych w płynie o fizjologicznym pH lub po jego zakwaszeniu niesie ładunek elektryczny różny od zera, więc ich ruch w roztworze może być kontrolowany przez zewnętrzne pole elektryczne ustalone przez eksperymentatora. Stosując obwód prądu stałego w trybie ciągłym można zapewnić obecność stałego pola elektrycznego utrzymującego neurotransmiter w pipecie podającej. Włączenie kolejnego obwodu generującego pole elektryczne pozwala na kierowanie neurotransmitera poza obszar pipety w sposób, który naśladuje lokalne wydzielenie go w tkance nerwowej. Wykorzystując tę metodę, możliwe jest poszukiwanie związków o pożądanym działaniu na aktywność neuronalną, badanie leków bądź funkcji wybranych neurotransmiterów. Zastosowanie tej techniki w skrawkach mózgowych zwierząt poddanych różnorodnym czynnikom stresowym wykazało m.in. osłabienie długotrwałego wzmocnienia (LTP) i wzrost długoterminowego osłabienia synaptycznego (LTD) w rejonie CA1 hipokampa, odmiennie niż w regionie zakrętu zębatego. Sugeruje to, że różne synapsy pobudzające w obrębie tej samej struktury mogą odmiennie reagować na stres. Istotnie, w ciele migdałowatym, stres unieruchomienia zwiększa LTP i prądy NMDA w neuronach jądra migdałowatego podstawno-bocznego, ale upośledza LTP w połączeniach ciała migdałowatego do kory przedczołowej (VOSE i STANTON 2017). Natomiast długoterminowe stosowanie antydepresanta fluoksetyny zwiększa lokalnie wywołane potencjały polowe będące wynikiem aktywności synaps pobudzających, ale upośledza LTP i LTD selektywnie w regionie CA1 hipokampa (RUBIO i współaut. 2013). Działanie to prawdopodobnie wynika z podwyższonego poziomu serotoniny, która ma istotny i negatywny wpływ na plastyczność funkcjonalną w hipokampie.

Współczesną odmianą techniki potencjałów polowych, zdobywającą coraz większą popularność, są macierze wieloelektrodowe (Ryc. 3C). W tym przypadku elektrody (zwykle 64) są wdrukowane w płytki hodowlane i umożliwiają rejestrację w czasie rzeczywistym wyładowań dziesiątek neuronów w sieci *in vitro*. Taki układ pomiarowy daje możliwość wysokoprzepustowej analizy wpływu wielu związków chemicznych i ich potencjalnego neuroaktywnego działania, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na wzór wyładowań neuronów i interakcje sieciowe.

Powyższe metody eksperymentalne mają jedną wadę: ingerują w integralność tkanki nerwowej. Dlatego istotnym uzupełnieniem powyższych modeli badawczych są rejestracje elektrycznej czynności mózgu u ludzi za pomocą elektroencefalografu. Rozmieszczone na powierzchni skóry czaszki elektrody umożliwiają rejestracje zmian potencjału elektrycznego, pochodzące przede wszystkim od aktywności neuronów kory mózgu, podobnie jak w wyżej opisanej technice pomiaru potencjałów polowych. Dziewiętnaście elektrod w układzie zalecanym przez Międzynarodową Federację Neurofizjologii Klinicznej do badań klinicznych, rejestruje fale mózgowe o częstotliwości od 1 do 100Hz i amplitudzie od 5 do kilkuset mikrowoltów. W ostatnich latach wykazano, że pacjenci z depresją charaktery-

zują się mniejszą objętością kory płata czołowego mózgu oraz liczbą połączeń i aktywnością kory zakrętu obręczy (SMART i współaut. 2015). Badanie EEG wdraża się we wczesnym diagnozowaniu depresji, bowiem pacjenci wykazują większą aktywność w paśmie fal wolnych alfa (1-4Hz), szczególnie w lewej części kory przedczołowej oraz zwiększoną aktywność neuronów brzuszno-przyśrodkowej części kory przedczołowej (SMART i współaut. 2015). Pacjenci z rozwijającą się depresją i niskim poziomem serotoniny charakteryzują się zwiększonym potencjałem EEG w elektrodach rejestrujących z kory przedczołowej (Fp1, Fp2 i Fpz) w odpowiedzi na bodźce dźwiękowe, dlatego zaproponowano nową metodę wczesnej detekcji depresji opartą na tej obserwacji (CAI i współaut. 2018). Jednym z objawów depresji są zaburzenia snu. Zagadnienie to badane jest od dekad za pomocą EEG. W ten sposób zaobserwowano u chorych m.in. zwiększenie częstotliwości ruchów gałek ocznych w fazie REM, skrócenie czasu trwania fazy REM czy zmiany zapisu fal wolnych (<4Hz) (OLBRICH I ARNS 2013). Wydaje się, że połączenie zapisów EEG z innymi badaniami diagnostycznymi może w przyszłości stać się wydajnym predyktorem depresji we wczesnym etapie jej powstawania. Z kolei w modelach zwierzęcych istnieje obecnie możliwość prowadzenia badań korelacyjnych, łączących techniki behawioralne, elektrofizjologiczne i obrazowania tkanki nerwowej.

METODY PROTEOMICZNE I ICH ZASTOSOWANIE W DIAGNOSTYCE DEPRESJI

W ostatnich latach nastąpił ogromny wzrost znaczenia badań proteomicznych w wielu dziedzinach biologii i medycyny. Proteomika to jedna z najmłodszych i jednocześnie szybko rozwijających się dyscyplin naukowych. Jest ona definiowana jako nauka zajmująca się proteomem (ang. PROTEin complement of the genOME), czyli komponentem białkowym kodowanym przez genom (WILKINS i współaut. 1996). Proteom jest zestawem wszystkich białek występujących w komórce, tkance czy organizmie w określonym czasie. Głównym celem badań proteomicznych jest identyfikacja białek produkowanych przez komórki i narządy zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Proteomika obejmuje trzy główne obszary: analizę ekspresji białek i ich wzajemnych zależności, badanie modyfikacji potranslacyjnych białek (PTM) oraz poznanie ich struktury (TYERS i MANN 2003).

Jednym z najczęściej stosowanych podejść proteomicznych w diagnostyce jest porównywanie składów białkowych (tzw. profili białkowych) osób zdrowych i chorych. Wykrywane zmiany w profilu białkowym mogą być traktowane jako markery biologiczne (biomarkery) danego stanu patologicznego. Ponadto, analiza różnicowa proteomów dostarcza informacji na temat potencjalnych celów terapeutycznych i dzięki temu może być wykorzystana do opracowania nowych leków. Warto jednak pamiętać, że ilość białek i ich funkcje w komórce są kontrolowane nie tylko przez szybkość ich powstawania i degradacji, ale także przez modyfikacje potranslacyjne. Procesy te polegają na przyłączeniu m.in. określonych grup funkcyjnych do cząsteczki białka. Takie modyfikacje wpływają na strukturę białek, ich interakcje, stabilność i lokalizację. Dotychczas opisano około 300 różnych modyfikacji potranslacyjnych. Wśród nich występują: fosforylacja, ubikwitynacja, palmitylacja i nitrozylacja (MANN i JENSEN 2003). Postęp związany z rozwojem technik poroteomicznych sprawia, że sukcesywnie odkrywane są kolejne. Proteomika strukturalna zajmuje się przede wszystkim poznawaniem struktury przestrzennej białek i precyzyjnym określeniem miejsc ich oddziaływania z innymi białkami, bądź związkami małocząsteczkowymi, np. lekami.

Rozwój badań proteomicznych jest nierozerwalnie związany z doskonaleniem techniki analitycznej, spektrometrii mas. Technika ta oparta jest na jonizacji cząsteczek, a następnie detekcji liczby i stosunku masy do ładunku (m/z) powstających jonów. Postęp w tej dziedzinie polega na opracowywaniu nowych metod jonizacji, sposobów rozdziału generowanych jonów oraz podwyższeniu czułości metody. Podstawowymi problemami neuroproteomiki są: heterogenność próbek biologicznych (komórki nerwowe i komórki gleju), zależna od typu komórki ekspresja białek czy w końcu subkomórkowa lokalizacja i modyfikacja białek. Obecnie nie istnieje proteomiczna metoda, która pozwoliłaby na jednoczesne zidentyfikowanie kompletnego proteomu. W związku z tym, wykorzystuje się różnorodne techniki frakcjonowana proteomu, a poszczególne subfrakcje są następnie analizowane osobno. Frakcjonowanie subkomórkowe nie tylko zmniejsza złożoność neuroproteomu, lecz umożliwia wzbogacenie białek występujących w komórkach w mniejszej liczebności, takich jak cząsteczki sygnałowe. Ponadto, nawet w stanach fizjologicznych białka zmieniają lokalizację, przemieszczając się między cytoplazmą a błoną komórkową. Przykładem podejścia eksperymentalnego, unikatowego dla tkanki nerwowej, są doświadczenia z użyciem synaptosomów i białek zagęszczenia postsynaptycznego (ang. postsynaptic density, PSD) (DIETERICH

i KREUTZ 2016). Synaptosomy są to artefaktowe struktury, które powstają w wyniku łagodnej homogenizacji tkanki nerwowej. Tworzą je oderwane zakończenia nerwowe zawierające pełen aparat synaptyczny, czyli m.in.: błonę presynaptyczą i postsynaptyczną, pęcherzyki synaptyczne, mitochondria, rybosomy oraz specyficznie ulokowane w synapsach białka cytoplazmatyczne. Ograniczenie złożoności układu pozwoliło na dużo pełniejszą identyfikację jego składników pod względem składu białkowego, jak i modyfikacji potranslacyjnych białek synaptycznych. Dotychczas zidentyfikowano ponad 5000 białek synaptycznych. Co więcej pokazano, że bardzo duża część tych białek ulega modyfikacjom potranslacyjnym, takim jak: fosforylacja, nitrozylacja czy palmitylacja. Kolejną frakcją białek neuronalnych, często wykorzystywaną w badaniach proteomicznych, jest zagęszczenie postsynaptyczne (PSD). Jest to złożona, wielobiałkowa struktura, zlokalizowana przy błonie postsynaptycznej synaps pobudzających i specjalizująca się w odbieraniu i przekazywaniu sygnałów w neuronach. Frakcja ta zawiera różne klasy receptorów postsynaptycznych wraz ze składnikami specyficznych szlaków sygnałowych. Dzięki rozwojowi technik spektrometrii mas w zagęszczeniu postsynaptycznym zidentyfikowano około 2000 białek zarówno u ludzi, jak i w modelach zwierzęcych. Badania proteomiczne pokazały, że białka PSD tworzą duże, hierarchicznie połączone kompleksy, wśród których można wyróżnić trzy grupy: receptory błonowe i kanały jonowe (np. NMDA i AMPA), białka kotwiczące i adaptorowe (np. PSD-95, Shank, Homer) oraz białka cytoszkieletu (np. neurofilamenty).

W kolejnym etapie badań często dokonuje się wstępnego rozdzielenia białek przy użyciu jedno- lub dwukierunkowej elektroforezy (2-DE) w żelach poliakrylamidowych. Po rozdziale poszczególne białka są wycinane z żelu i poddawane trawieniu enzymem proteolitycznym, a następnie osobno analizowane w spektrometrze mas w celu identyfikacji. Rozwinięciem tego podejścia stało się różnicowe wybarwianie białek poddawanych wspólnej elektroforezie związkami fluorescencyjnymi (2-DE DIGE) (LARANCE i LAMOND 2015). Obecnie w analizie ilościowej stosuje się tzw. 'shotgun proteomics' (z ang.), w którym do spektrometru wprowadzana jest mieszanina peptydów pochodzących z trawienia wszystkich białek znajdujących się w badanej próbce biologicznej. W metodzie tej często stosuje się dodatkowy rozdział białek/peptydów oparty na ich właściwościach fizykochemicznych np. ultrawirowanie (gęstość), elektroforezę kapilarną (wielkość i ładunek), ogniskowanie izoelektryczne IEF (pI), chromatografię jonowymienną (ładunek) czy chromatografię w układzie faz odwróconych (hydrofobowość). W celu znakowania wybranych białek można stosować tzw. znakowanie metaboliczne, SILAC (ang. stable isotope labeling in cell culture) (ONG i współaut. 2002). W trakcie hodowli komórek określony aminokwas w pożywce zostaje zastąpiony wyznakowanym analogiem i metabolicznie wbudowany do białek. Następnie, próby kontrolne i wyznakowane są ze sobą łączone i wspólnie poddawane analizie. Uzyskane dane pozwalają na określenie ewentualnych różnic między próbkami. W przypadku analizy tkanek zwierzęcych rzadko używa się znaczników metabolicznych, głównie ze względu na ogromne koszty takich eksperymentów, związane z koniecznością wyznakowania wszystkich tkanek zwierzęcia w trakcie jego rozwoju. Dużo częściej stosowane są metody takie jak: ICAT (ang. isotope-coded affinity tag) czy iTRAQ (ang. isobaric tag for relative and absolute quantitation), w których białka znakowane są dopiero po ich wyizolowaniu, (LARANCE i LAMOND 2015). W metodzie ICAT białka wyizolowane z komórek są znakowane izotopowo, łączone ze sobą i analizowane za pomocą spektrometrii mas. Natomiast w przypadku metody iTRAQ, peptydy w próbce są znakowane znacznikami izobarycznymi, które podczas fragmentacji generują charakterystyczne jony (tzw. jony reporterowe) umożliwiające analizę ilościową.

Jedną z najlepiej zbadanych modyfikacji potranslacyjnych jest fosforylacja. Badania nad tą modyfikacją prowadzone są od dziesięcioleci, ale dopiero znaczący postęp w spektrometrii mas zrewolucjonizował analizę tej modyfikacji, umożliwiając precyzyjną i szybką identyfikację miejsc fosforylacji w białkach. Jednak ostatnio wyraźnie wzrosło zainteresowanie innymi modyfikacjami, takimi jak palmitylacja czy nitrozylacja (ZAREBA-KOZIOL i współaut. 2018). Pierwsza grupa stosowanych tu metod obejmuje metody metabolicznego znakowania polegające na wbudowywaniu syntetycznych analogów kwasów tłuszczowych w miejsce endogennego kwasu tłuszczowego. Druga grupa zawiera metody oparte na selektywnym uwolnieniu palmitynianu i tlenku azotu z cystein za pomocą specyficznych reduktorów. Najnowsza metoda PANIMoni (ang. palmitylation and nitrosylation monitoring) pozwala na symultaniczną analizę palmitylacji i nitrozylacji (ZAREBA-KOZIOL i współaut. 2019). To podejście opiera się na selektywnej redukcji palmitylowanych i nitrozylowanych cystein przy pomocy hydroksyloaminy i kwasu askorbinowego oraz podstawieniu w miejsce uprzednio modyfikowanych tioli pochodnej biotyny. Na-

Tabela 1. Badania proteomiczne w zwierzęcych modelach depresji (CARBONI 2014).

Gatunek	Model depresji	Tkanka	Metoda proetomiczna
Myszy CD1	chroniczna iniekcja kortykosteronu	podwzgórze hipokamp kora	DIGE
Szczury Sprague-Dawley	stres prenatalny	hipokamp	2-DE
Myszy C57BL/6J	stres na wczesnym etapie życia	kora przedczołowa	Label free
Szczury Wistar	chroniczny łagodny stres	hipokamp (ca1, ca3)	iTRAQ
Szczury Wistar	chroniczny łagodny stres	hipokamp	DIGE
Szczury Wistar	chroniczny łagodny stres	hipokamp (dg)	2DE
Szczury Sprague-Dawley	chroniczny stres unieruchomieniowy	cały mózg	DIGE
Szczury Sprague-Dawley	chroniczny łagodny stres	hipokamp	2DE
Szczury Sprague-Dawley	chroniczny łagodny stres	kora przedczołowa	2DE
Szczury Sprague-Dawley	chroniczny łagodny stres	hipokamp (frakcja synaptosomalna)	2DE
Szczury Sprague-Dawley	chroniczny łagodny stres	hipokamp	iTRAQ

stępnie białka poddawane są cięciu proteolitycznemu. Dzięki zastosowaniu chromatografii powinowactwa i złoża zawierającego awidynę, możliwe jest wyodrębnienie tą metodą, jedynie tych peptydów, które uprzednio były modyfikowane. Połączenie tej techniki analitycznej z metodą spektrometrii mas pozwala na jakościową i ilościową analizę różnicową palmitylacji i nitrozylacji, a także identyfikację precyzyjnych miejsc tych modyfikacji w endogennych białkach.

Opisane wyżej narzędzia proteomiczne umożliwiają porównanie proteomów osób zdrowych i cierpiących na różne schorzenia. Taka analiza przybliża poznanie przyczyn, mechanizmów i przebiegu tych schorzeń. Metody te są wykorzystywane do badań zarówno u pacjentów, jak i w zwierzęcych modelach chorób. Pierwsze badania proteomiczne stosowane w depresji wykorzystywały płyn mózgowo-rdzeniowy osób zdrowych oraz pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą. Używając klasycznych metod proteomicznych, czyli dwuwymiarowych żeli 2-DE w połączeniu ze spektrometrią mas, zidentyfikowano 39 białek (m.in. apoliporoteiny E i prostaglandyny-D2) o znacząco zmienionej ekspresji u osób chorych. ZHANG i współaut. (2019), stosując te same techniki badawcze, udowodnili przydatność oznaczeń apolipoproteiny E w płynie mózgowo-rdzeniowym jako potencjalnego markera depresji. Natomiast przy użyciu wielkoskalowej metody iTRAQ, w osoczu pacjentów z depresją znaleziono dziewięć białek z zaburzoną ekspresją. Oba wspomniane białka są związane głównie z metabolizmem lipidów i układem odpornościowym. Autorzy tych badań wskazują, że są to procesy, które mogą być zaangażowane we wczesne stadia patofizjologii depresji. Bardzo interesujący kierunek badań, zmierzający do identyfikacji nowych białkowych markerów depresji, wskazuje praca JOHNSTON-WILSONA i współaut. (2000). Wykorzystując techniki 2DE, DIGE i spektrometrię mas autorzy dokonali analizy próbek *post mortem* uzyskanych z mózgów pacjentów ze zdiagnozowaną depresją i osób z grupy kontrolnej. W ten sposób zidentyfikowano pięć białek różniących się ekspresją w korze przedczołowej u pacjentów kliniki psychiatrycznej, w porównaniu z grupą kontrolną. Do białek tych należą na przykład aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu, anhydraza węglanowa 1 czy kwaśne fibylarne białko glejowe. Ponadto, analiza ilościowa białek kory przedczołowej z użyciem metody 'lable free' u osób ze zdiagnozowaną depresją wykazała obecność aż 39 białek o zaburzonej ekspresji, czyli potencjalnych białkowych markerów depresji. Wśród białek istotnie różniących się poziomem ekspresji wyróżniono białka zaangażowane w plastyczność synaptyczną, metabolizm energetyczny, czy organizację cytoszkieletu.

Alternatywą dla ludzkiej tkanki pozyskiwanej od pacjentów z depresją są zwierzęce modele chorób, które z powodzeniem znajdują zastosowanie w badaniach proteomicznych zmierzających do poznania natury oraz sposobów leczenia stanów psychopatologicznych zachodzących w organizmie. Stosowanie modeli zwierzęcych zakłada, że określone zmiany zachowania zwierząt wywołane w

warunkach eksperymentalnych są odwzorowaniem symptomów zaburzeń psychiatrycznych. W ciągu ostatnich kilku lat przeprowadzono szereg badań proteomicznych z użyciem zwierzęcych modeli depresji mających na celu identyfikację molekularnych podstaw tej choroby (Tabela 1). Wyniki tych badań pokazały, że stres wywołuje zmiany poziomu białek związanych z plastycznością synaptyczną, organizacją cytoszkieletu, morfogenezą oraz metabolizmem energetycznym. Pomimo ogromnych postępów jakie poczyniono w rozwoju i zastosowaniu wielkoskalowych technik takich jak transkryptomika i proteomika, niewiele wiadomo na temat modyfikacji potranslacyjnych w patogenezie depresji. Ostatnie badania wskazują na znaczącą rolę modyfikacji cystein: palmitylacji i nitrozylacji. W mysim modelu depresji, dzięki wykorzystaniu nowej metody PANIMoni, łączącej metody biochemiczne ze spektrometrią mas, zidentyfikowano nie tylko białka, ale także specyficzne miejsca w białku ulegające palmitylacji i nitrozylacji. Spośród wszystkich zidentyfikowanych białek wyróżniono 122 białka wykazujące zaburzoną interakcję tych dwóch modyfikacji. Wśród nich znalazły się białka zaangażowane w procesy plastyczności synaptycznej (PSD-95, Shank, podjednostki receptora NMDA), organizację cytoszkieletu i metabolizm energetyczny.

Badania proteomiczne dotyczące depresji koncentrują się również na sprawdzeniu skuteczności stosowanych leków. W jednym z modeli depresji, szczurom podawano lek antydepresyjny fluoksetynę, a następnie po dwu tygodniach badano profil białkowy hipokampa (CARBONI 2014). Wykazano zależność między długością trwania leczenia a zmienioną ekspresją 30 białek, zaangażowanych głównie w neurogenezę i procesy regeneracyjne komórki. W innych badaniach nad mechanizmem działania fluoksetyny potwierdzono, że lek ten znacząco moduluje ekspresję białek związanych z neurogenezą, takich jak białko BDNF (SAIRANEN i współaut. 2005). Przy użyciu metod proteomicznych badano również wpływ nowego leku antydepresyjnego ketaminy na poziom białek kory przedczołowej i hipokampa (LI i współaut. 2010). W badaniach tych pokazano, że niskie dawki ketaminy działają przez aktywację szlaków sygnałowych rapamycyny. Co więcej wykazano, że ketamina powoduje zwiększoną ekspresję białek synaptycznych, w tym białka PSD-95, synapsyny-1 i podjednostki receptora AMPA (GLUR1) w środkowej korze przedczołowej szczurów i podjednostek receptora AMPA (GLUR1 i GLUR2) w hipokampie myszy.

Podsumowując, zrozumienie mechanizmu chorób psychicznych wydaje się niezwykle trudne. Jak staraliśmy się wykazać powyżej, łączenie nowoczesnych technik badawczych z różnych obszarów nauki oraz stosowanie modeli zwierzęcych jest niezbędne do pełnego zrozumienia patomechanizmu depresji oraz do opracowania nowych skutecznych terapii.

Streszczenie

Depresja należy obecnie do najczęstszych chorób psychicznych na świecie, lecz dostępność jej skutecznych terapii jest ograniczona. Brak pełnego zrozumienia mechanizmów molekularnych i komórkowych leżących u podstaw tej choroby utrudnia opracowanie nowych i efektywnych metod leczenia. Zdolność adaptacji ośrodkowego układu nerwowego przejawia się plastycznością neuronalną, którą polega m.in. na reorganizacji połączeń synaptycznych przez zmiany ich budowy czy wydajności przekazywanej przez nie informacji. Bodźce awersyjne takie jak stres czy ból, pojawiające się chronicznie, mogą wywoływać depresję, która na poziomie komórkowym objawia się zaburzeniem plastyczności neuronalnej. W niniejszym artykule prezentujemy wybrane techniki eksperymentalne stosowane współcześnie w badaniach patomechanizmu depresji, takie jak: obrazowanie struktury neuronów, pomiary ich aktywności elektrycznej oraz metody proteomiczne. Ponadto omówione zostały również modele zwierzęce, w których próbuje się odzwierciedlić wybrane aspekty choroby, występujące u ludzi z depresją. Wydaje się, że łączenie różnych technik badawczych z modelami zwierzęcymi pozwoli nam w najbliższych latach na głębsze poznanie patomechanizmu depresji oraz opracowanie nowych, skutecznych terapii.

LITERATURA

BAILEY C. H., KANDEL E. R., HARRIS K. M., 2015. *Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation.* Cold Spring Harb Perspect Biol 7, a021758.

BANASR M., DWYER J. M., DUMAN R. S., 2011. *Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment.* Curr. Opin. Cell Biol. 23, 730-737.

BASU S., PLEWCZYNSKI D., SAHA S., ROSZKOWSKA M., MAGNOWSKA M., BACZYNSKA E., WLODARCZYK J., 2016. *2dSpAn: semiautomated 2-d segmentation, classification and analysis of hippocampal dendritic spine plasticity.* Bioinformatics 32, 2490-2498.

BASU S., SAHA P. K., ROSZKOWSKA M., MAGNOWSKA M., BACZYNSKA E., DAS N., PLEWCZYNSKI D., WLODARCZYK J., 2018. *Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines.* Sci. Rep. 8, 3545.

BOURNE J. N., HARRIS K. M., 2008. *Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines.* Annu. Rev. Neurosci. 31, 47-67.

BRICKLEY S. G., MODY I., 2012. *Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease.* Neuron 73, 23-34.

CAI H., HAN, J., CHEN, Y., SHA, X., WANG, Z. JING YANG, B., FENG, L., DING, Z., CHEN,Y., GUTKNECHT, J., 2018. *A pervasive approach to EEG-based depression detection.* Complexity 2018.

CARBONI L., 2014. *Proteomics of preclinical models of depression.* [W:] *Proteomics and Metabolomics in Psychiatry.* MARTINS-DE-SOUZA D. (red.). Adv. Biol. Psychiatry. 29, Basel, Karger, 92-102.

CHIDAMBARAM S. B., RATHIPRIYA A. G., BOLLA S. R., BHAT A., RAY B., MAHALAKSHMI A. M., MANIVASAGAM T., THENMOZHI A. J., ESSA M. M., GUILLEMIN G. J., CHANDRA R., SAKHARKAR M. K., 2019. *Dendritic spines: Revisiting the physiological role*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 92, 161-193.

CITRI A., MALENKA R. C., 2008. *Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms*. Neuropsychopharmacology 33, 18-41.

COLE K. S., 1949. *Some physical aspects of bioelectric phenomena*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 35, 558-566.

CONRAD C. D., ORTIZ J. B., JUDD J. M., 2017. *Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: Methodological and functional considerations*. Physiol. Behav. 178, 66-81.

DIETERICH D. C., KREUTZ M. R., 2016. *Proteomics of the synapse - A quantitative approach to neuronal plasticity*. Mol. Cell. Proteomics 15, 368-381.

DRAPAŁA A., KARCZEWICZ, E., ZALEWSKA, H., GIERCZYŃSKI, J., GRYGLEWICZ, J., SIELICKI, P., WRONA, W., 2014. *Depresja - analiza kosztów ekonomicznych i społecznych*. Instytut Zarządzania w Ochronie Zdrowia.

DUMAN R. S., AGHAJANIAN G. K., SANACORA G., KRYSTAL J. H., 2016. *Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants*. Nat. Med. 22, 238-249.

FARRANT M., NUSSER Z., 2005. *Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors*. Nat. Rev. Neurosci. 6, 215-229.

GIDEONS E. S., KAVALALI E. T., MONTEGGIA L. M., 2014. *Mechanisms underlying differential effectiveness of memantine and ketamine in rapid antidepressant responses*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 8649-8654.

GURURAJAN A., REIF A., CRYAN J. F., SLATTERY D. A., 2019. *The future of rodent models in depression research*. Nat. Rev. Neurosci. 20, 686-701.

JOHNSTON-WILSON N. L., SIMS C. D., HOFMANN J. P., ANDERSON L., SHORE A. D., TORREY E. F., YOLKEN R. H., 2000. *Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder*. Mol. Psychiatry 5, 142-149.

KRAUS C., KADRIU B., LANZENBERGER R., ZARATE C. A., JR., KASPER S., 2019. *Prognosis and improved outcomes in major depression: a review*. Transl. Psychiatry 9, 127.

KRZYSTYNIAK A., BACZYNSKA E., MAGNOWSKA M., ANTONIUK S., ROSZKOWSKA M., ZAREBA-KOZIOL M., DAS N., BASU S., PIKULA M., WLODARCZYK J., 2019. *Prophylactic ketamine treatment promotes resilience to chronic stress and accelerates recovery: correlation with changes in synaptic plasticity in the CA3 subregion of the hippocampus*. Int. J. Mol. Sci. 20, doi: 10.3390/ijms20071726.

LAI K. O., IP N. Y., 2013. *Structural plasticity of dendritic spines: the underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders*. Biochim. Biophys. Acta 1832, 2257-2263.

LARANCE M., LAMOND A. I., 2015. *Multidimensional proteomics for cell biology*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 16, 269-280.

LEZAK K. R., MISSIG G., CARLEZON W. A. JR., 2017. *Behavioral methods to study anxiety in rodents*. Dialogues Clin. Neurosci. 19, 181-191.

LI N., LEE B., LIU R. J., BANASR M., DWYER J. M., IWATA M., LI X. Y., AGHAJANIAN G., DUMAN R. S., 2010. *mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists*. Science 329, 959-964.

LIU M. Y., YIN C. Y., ZHU L. J., ZHU X. H., XU C., LUO C. X., CHEN H., ZHU D. Y., ZHOU Q. G., 2018. *Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice*. Nat. Protoc. 13, 1686-1698.

MALHI G. S., MANN J. J., 2018. *Depression*. Lancet 392, 2299-2312.

MANN M., JENSEN O. N., 2003. *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nat. Biotechnol. 21, 255-261.

MARKRAM H., GERSTNER W., SJOSTROM P. J., 2012. *Spike-timing-dependent plasticity: a comprehensive overview*. Front Synaptic Neurosci 4, 2.

MILLER O. H., YANG L., WANG C. C., HARGRODER E. A., ZHANG Y., DELPIRE E., HALL B. J., 2014. *GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine*. Elife 3, e03581.

MONTGOMERY S. A., MOLLER H. J., 2009. *Is the significant superiority of escitalopram compared with other antidepressants clinically relevant?* Int. Clin. Psychopharmacol. 24, 111-118.

OLBRICH S., ARNS M., 2013. *EEG biomarkers in major depressive disorder: discriminative power and prediction of treatment response*. Int. Rev. Psychiatry 25, 604-618.

ONG S. E., BLAGOEV B., KRATCHMAROVA I., KRISTENSEN D. B., STEEN H., PANDEY A., MANN M., 2002. *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol. Cell. Proteomics 1, 376-386.

PERONA M. T., WATERS S., HALL F. S., SORA I., LESCH K. P., MURPHY D. L., CARON M., UHL G. R., 2008. *Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions*. Behav. Pharmacol. 19, 566-574.

PHILLIPS C., 2017. *Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection*. Neural Plast. 2017, 7260130.

QIAO H., LI M. X., XU C., CHEN H. B., AN S. C., MA X. M., 2016. *Dendritic spines in depression: What we learned from animal models*. Neural Plast. 2016, 8056370.

RUBIO F. J., AMPUERO E., SANDOVAL R., TOLEDO J., PANCETTI F., WYNEKEN U., 2013. *Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield*. Front. Cell. Neurosci. 7, 66.

SAIRANEN M., LUCAS G., ERNFORS P., CASTREN M., CASTREN E., 2005. *Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus*. J. Neurosci. 25, 1089-1094.

SCHILSTROM B., KONRADSSON-GEUKEN A., IVANOV V., GERTOW J., FELTMANN K., MARCUS M. M., JARDEMARK K., SVENSSON T. H., 2011. *Effects of S-citalopram, citalopram, and R-citalopram on the firing patterns of dopamine neurons in the ventral tegmental area, N-methyl-D-aspartate receptor-mediated transmission in the medial prefrontal cortex and cognitive function in the rat*. Synapse 65, 357-367.

SMART O. L., TIRUVADI V. R., MAYBERG H. S., 2015. *Multimodal approaches to define ne-*

twork oscillations in depression. Biol. Psychiatry 77, 1061-1070.
Szasz B. K., Mike A., Karoly R., Gerevich Z., Illes P., Vizi E. S., Kiss J. P., 2007. *Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D--aspartate receptors in the central nervous system*. Biol. Psychiatry 62, 1303-1309.
Tyers M., Mann M., 2003. *From genomics to proteomics*. Nature 422, 193-197.
Vose L. R., Stanton P. K., 2017. *Synaptic plasticity, metaplasticity and depression*. Curr. Neuropharmacol. 15, 71-86.
Wang H., 2018. *Modeling neurological diseases with human brain organoids*. Front. Synaptic Neurosci. 10, 15.
Wang Q., Timberlake M. A., 2nd, Prall K., Dwivedi Y., 2017. *The recent progress in animal models of depression*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 77, 99-109.
Who, 1993. *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: Diagnostic criteria for research*. https://www.who.int/classifications/icd/en/GRNBOOK.pdf.
Who, 2017. *Depression and other common mental disorders: global health estimate*. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf.
Wilkins M. R., Sanchez J. C., Gooley A. A., Appel R. D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D. F., Williams K. L., 1996. *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev 13, 19-50.
Zareba-Koziol M., Bartkowiak-Kaczmarek A., Figiel I., Krzystyniak A., Wojtowicz T., Bijata M., Wlodarczyk J., 2019. *Stress-induced changes in the S-palmitoylation and S-nitrosylation of synaptic proteins*. Mol. Cell. Proteomics 18, 1916-1938.
Zareba-Koziol M., Figiel I., Bartkowiak-Kaczmarek A., Wlodarczyk J., 2018. *Insights into protein S-palmitoylation in synaptic plasticity and neurological disorders: Potential and limitations of methods for detection and analysis*. Front. Mol. Neurosci. 11, 175.

KOSMOS Vol. 69, 1, 185–200, 2020

Ewa Bączyńska, Adam Krzystyniak, Monika Zaręba-Kozioł, Izabela Figiel, Jakub Włodarczyk, Tomasz Wójtowicz

Laboratory of Cell Biophysics, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw, Poland,
E-mail: j.wlodarczyk@nencki.edu.pl; t.wojtowicz@nencki.edu.pl

CONTEMPORARY RESEARCH TECHNIQUES EMPLOYED IN EXPERIMENTAL STUDIES OF ABERRANT NEURONAL PLASTICITY IN DEPRESSION

Summary

Depression is the most common psychiatric disease but the effectiveness of available therapies is limited. The underlying molecular and cellular mechanisms are largely unknown and significantly limit the treatment strategies. Neuronal plasticity is crucial for adaptation of the central nervous system to the environment and requires the reorganization of existing synapses, their structure and efficacy of information transfer. Aversive cues such as stress or pain when chronic may induce depression and aberrant neuronal plasticity on the cellular level. In this article we present selected experimental techniques currently employed in studies of the pathomechanism of depression, including structural imaging, electrophysiology and proteomic analysis. We also review current animal models that reflect some aspects of depression observed in humans. Combining of multidisciplinary approach and multiple research techniques with animal models should provide us with a better understanding of the pathomechanism of depression and allow to formulate more efficient therapies.

Key words: dendritic spines, depression, neuronal plasticity, structural plasticity, synapse