

# Rola stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz szlaku katabolitów tryptofanu w patogenezie depresji

dr Paulina Wigner✉,

prof. dr hab. Tomasz Śliwiński

Pracownia Genetyki Medycznej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_436](https://doi.org/10.18388/pb.2021_436)

✉ autor korespondujący: paulina.wigner@biol.uni.lodz.pl

**Słowa kluczowe:** depresja, chroniczny łagodny stres, stres oksydacyjny, stres nitracyjny, szlak katabolitów tryptofanu

**Wykaz skrótów:** CAT – katalaza; CIS – przewlekły stres związany z unieruchomieniem; CMS – model chronicznego łagodnego stresu; CUMS – chroniczny, nieprzewidywalny, łagodny stres; GPx1/4 – peroksydaza glutationowa 1/4; IDO1 – 2,3-dioksygenaza indolaminowa 1; KATI/II – aminotransferaza kinureninowa I/II; LTP – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne; MDA – malonyldialdehyd; MS-HRM – analiza topnienia DNA o wysokiej rozdzielczości; NMDAR – receptor N-metylo-D-asparaginy; NO – tlenek azotu; PBMCs – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej; real-time PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy z detekcją produktu specyficznego w czasie rzeczywistym; RNS – reaktywne formy azotu; ROS – reaktywne formy tlenu; SNPs – polimorfizmy pojedynczego nukleotydu; SNRIs – inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny i noradrenaliny; SOD1/2 – dysmutaza nadtlenkowa 1/2; SSRIs – inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny; TCA – trójcykliczne leki przeciwdepresyjne; TPH1/2 – hydroksylaza tryptofanu 1/2; TRYCATs – szlak katabolitów tryptofanu

ARTYKUŁ OPUBLIKOWANY W  
RAMACH

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Firmy Merck Sp. z o.o. za Najlepszą Pracę Doktorską z Biochemii im. Witolda Drabikowskiego

Laureat: dr Paulina Wigner

TYTUŁ ROZPRAWY: Rola stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz szlaku katabolitów tryptofanu w patogenezie depresji

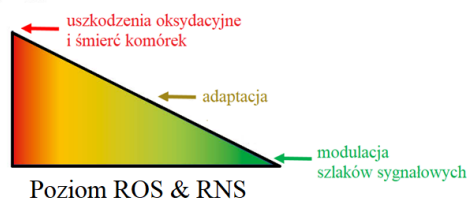
Promotor: prof. dr hab. Tomasz Śliwiński

## STRESZCZENIE

Depresja jest najczęstszą chorobą psychiczną, dotykającą około 350 mln ludzi na całym świecie. Pomimo licznych badań, etiologia tej choroby nadal pozostaje niejasna. Długoletnie badania sugerują udział powiązanych ze sobą szlaków biochemicznych, tj.: stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz nieprawidłowości szlaku katabolitów tryptofanu (szlak TRYCATs, ang. *tryptophan catabolites pathway*) w rozwoju zaburzeń depresyjnych. W związku z tym celem niniejszej pracy jest wyjaśnienie roli stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz zaburzeń przebiegu szlaku TRYCATs w molekularnym podłożu depresji. W niniejszej pracy podjęto próbę określenia wpływu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, zlokalizowanych w genach kodujących enzymy zaangażowane w stres oksydacyjny i nitracyjny oraz szlak TRYCATs na częstość występowania depresji. Ponadto, wykorzystując model *in vivo* depresji dokonano oceny wpływu bodźców stresowych chronicznego łagodnego stresu na ekspresję na poziomie mRNA i ilość białka oraz stopień metylacji regionów promotorowych genów kodujących enzymy zaangażowane w badane szlaki. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły udział badanych szlaków biochemicznych w patogenezie depresji na poziomie molekularnym.

## WPROWADZENIE

Zaburzenia psychiczne występują znacznie częściej niż którakolwiek przewlekła choroba somatyczna. Wśród tych zaburzeń najliczniejszą grupę stanowią zaburzenia afektywne, do których zaliczana jest depresja [1]. Depresja objawia się długotrwałym obniżeniem nastroju, któremu może towarzyszyć również uporczywe poczucie winy, anhedonia, niska samoocena, bezsenność, rozdrażnienie psychiczne i uczucie ciągłego zmęczenia, a także nawracające myśli samobójcze. Szacuje się, że na całym świecie około 350 milionów ludzi cierpi na depresję, z czego około 1,5 mln stanowią Polacy. Choroba ta dotyka zarówno kobiety, jak i mężczyzn, we wszystkich grupach wiekowych, przy czym najliczniejszą grupę pacjentów stanowią osoby w wieku 20-40 lat, a wśród kobiet i mężczyzn to kobiety chorują dwukrotnie częściej. Ponadto, ryzyko zachorowania na depresję wrasta wraz z wiekiem, około 20% osób po 65. roku życia cierpi na depresję [2-6]. Godnym uwagi pozostają alarmujące prognozy Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*), które sugerują, że do 2040 roku depresja stanie się najczęstszą przyczyną niepełnosprawności społeczeństwa [7]. Niestety, pomimo, iż depresja jest poważnym problemem zdrowotnym współczesnego społeczeństwa, ponad połowa chorych nie korzysta z pomocy lekarza. Co więcej, u 15-20% pacjentów może rozwinąć się przewlekła postać depresji, a jedna trzecia osób leczonych nie odpowiada na tradycyjną farmakoterapię [8,9]. Konwencjonalna terapia antydepresyjna obejmuje głównie leki działające jako inhibitory zwrotnego wychwytu neuroprzekazników, leki o receptorowych mechanizmach działania oraz inhibitory monoaminooksydazy. Najczęściej stosowane są leki pierwszej grupy, do której zaliczane są trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TCA, ang. *tricyclic antidepressants*), inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny i noradrenaliny (SNRIs, ang. *serotonin norepinephrine reuptake inhibitors*) oraz inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (SSRIs, ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*) [10]. Konsekwencją długotrwałej, nasilającej się i nieleczonej depresji mogą być próby samobójcze. Na świecie rocznie odnotowuje się około miliona samobójczych zgonów w grupie pacjentów cierpiących na depresję [11]. Co więcej, przewlekła depresja może również przyczynić się do rozwoju innych patologii, m. in.: chorób serca, udaru mózgu, osteoporozy czy cukrzycy [12]. Obok wzrastającej liczby nowych przypadków depresji i braku odpowiedzi na konwencjonalną terapię przeciwdepresyjną, depresja wiąże się również z wysokimi kosztami opieki medycznej. W Stanach Zjednoczonych całkowity koszt leczenia depresji sięga około 83,1 miliardów dolarów rocznie, a w Europie jest to około 118 miliardów dolarów. Dla porównania, leczenie niewydolności serca to koszt około 39,2 miliardów, a AIDS – około 50 miliardów dolarów rocznie [13-16].



**Rycina 1.** W warunkach homeostazy ROS/RNS są uwalniane w ilościach bezpiecznych dla komórki i mogą indukować różnicowanie komórek i apoptozę, wpływać na syntezę, uwalnianie lub dezaktywację tlenu azotu oraz mogą stymulować transport glukozy do komórek. Jednym z najważniejszych zadań realizowanych przez ROS/RNS jest regulacja procesów transmisji sygnału z komórki do komórki i w jej obrębie. Wyższe stężenia tych cząsteczek są toksyczne dla komórek, prowadząc do ich uszkodzenia, a nawet zniszczenia. Szkodliwe działanie ROS/RNS obejmuje m.in. utlenianie białek. Utlenione białka są nieodwracalnie uszkodzone i w konsekwencji są selektywnie usuwane przez proteazy, ale wraz ze starzeniem się komórek i obniżeniem ich aktywności proteolitycznej uszkodzone białka mogą gromadzić się w komórce. Utlenianie białek może prowadzić do przerwania łańcucha polipeptydowego, pojawienia się zmienionych reszt aminokwasowych i powstania dimerów lub agregatów białek. W konsekwencji zmiany te skutkują utratą czynnościowej aktywności enzymów, białek regulatorowych czy transporterów błonowych. ROS może również uszkadzać zasady purynowe i pirymidynowe, reszty cukrowe lub rozrywać wiązania fosfodiesterowe łączące nukleotydy. Prowadzi to do pęknięć nici DNA. Nadmierna produkcja ROS może skutkować również peroksydacją lipidów, zwłaszcza fosfolipidów błonowych, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki [27].

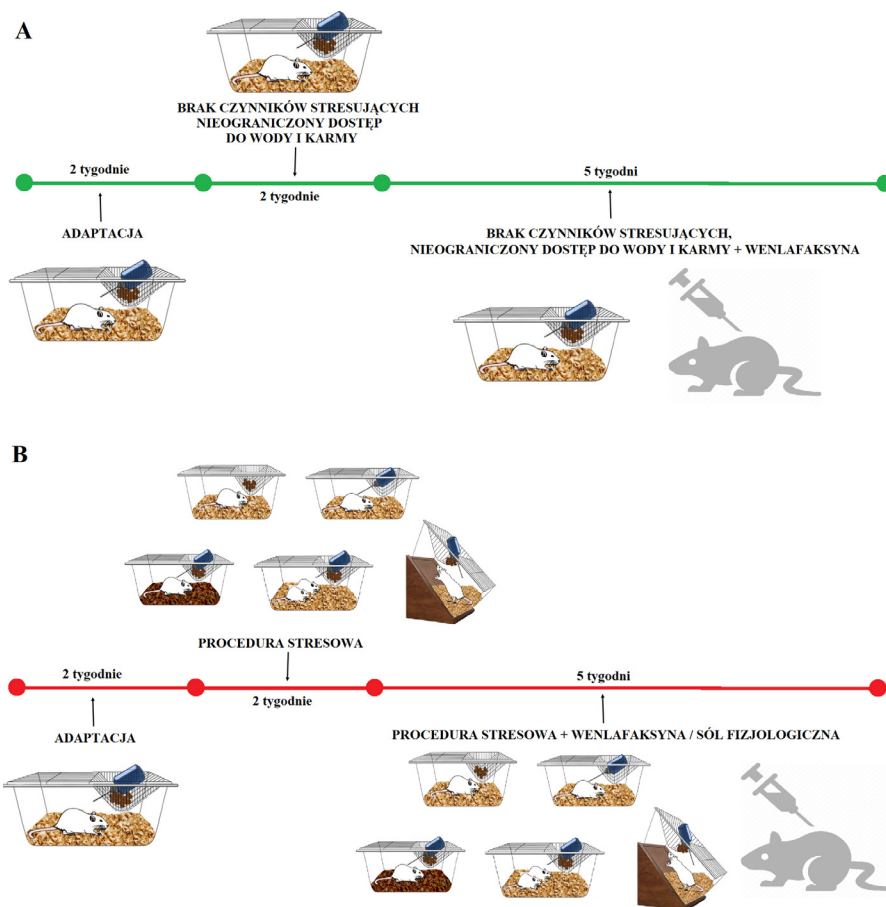
Pomimo intensywnych badań, mechanizm rozwoju depresji nadal pozostaje niejasny. Dotychczasowe badania wskazują na wieloczynnikowy charakter tej choroby, której rozwój i przebieg mogą zależeć od wielu czynników, w tym od indywidualnych cech biologicznych, czynników genetycznych oraz środowiskowych [17]. Co więcej, dotychczasowe dowody wskazują jednoznacznie, że depresja jest jednostką chorobową związaną ze zmianami w prawidłowym funkcjonowaniu mózgu, plastyczności neuronów i zmniejszoną objętością kory czołowej i hipokampu [18]. Jako główną przyczynę tych strukturalnych i funkcjonalnych zaburzeń w strukturze mózgu, które zaobserwowano w przebiegu depresji, upatruje się stres oksydacyjny. Badania przedkliniczne i kliniczne potwierdziły wpływ zwiększonego wytwarzania reaktywnych form tlenu i azotu (ROS, ang. *reactive oxygen species*; RNS, ang. *reactive nitrogen species*), jak również wyczerpania antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych, na zmiany struktury mózgu. Dotychczasowe analizy struktur mózgowych pacjentów z depresją potwierdziły, że obszary czołowe mózgu cechowały się zmniejszoną liczbą i wielkością komórek neuronalnych [19]. Zwiększona produkcja ROS może być dodatkowo wzmocniana na skutek zaburzeń przebiegu różnych szlaków metabolicznych, w tym szlaku katabolitów tryptofanu (TRYCATs, ang. *tryptophan catabolites pathway*). Skutkiem tych zaburzeń jest zwiększona produkcja neurotoksycznych związków, w tym kwasu chinolinowego, czy 3-hydroksykinureniny, które mogą zwiększać produkcję ROS, a w konsekwencji mogą indukować apoptozę neuronów, tym samym przyczyniając się do neurodegeneracji, obserwowanej w przebiegu depresji [20-26]. Postrzeganie depresji jako choroby dotykającej mózg komplikuje w znacznym stopniu trafną diagnostykę i terapię. W związku z tym istnieje uzasadniona konieczność poszukiwania biomarkerów molekularnych o potencjale diagnostycznym, które przyczynią się do udoskonalenia dotychczasowej diagnostyki, opartej głównie na wywiadzie lekarskim. Istotnym faktem jest to, iż biomarkery te

powinny cechować się nie tylko łatwością oznaczenia, ale również zdolnością odzwierciedlania zmian zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym. Ponadto, regulacja określonych procesów zaangażowanych w mechanizm rozwoju depresji na poziomie molekularnym może przyczynić się również do opracowania nowego, skutecznego i spersonalizowanego leczenia.

## ROLA STRESU OKSYDACYJNEGO I NITRACYJNEGO W ROZWOJU DEPRESJI

Stres oksydacyjny definiowany jest jako brak równowagi między produkcją ROS i RNS, a wydajnością systemów obrony antyoksydacyjnej komórki. W warunkach fizjologicznych oba mechanizmy równoważą się, a ROS i RNS w niskich stężeniach działają głównie jako przekaźniki sygnałów i determinują prawidłowe funkcjonowanie komórek (Ryc. 1) [27]. W przypadku komórek nerwowych niskie poziomy ROS są niezbędne m. in. dla regulacji ich prawidłowego wzrostu i rozwoju, jak również są zaangażowane w proces długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, ang. *long-term potentiation*) poprzez mechanizmy zależne od glutaminianu. LTP, jako zlokalizowany w ośrodkowym układzie nerwowym mechanizm neuronalny, stanowi podstawę tworzenia pamięci i uczenia się oraz powoduje zwiększenie intensywności przewodzenia synaptycznego [28,29]. Niestety, ROS i RNS odgrywają nie tylko kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mózgu, ale w wysokich stężeniach są zaangażowane w mechanizm rozwoju wielu chorób (Ryc. 1). Dotychczasowe badania oparte na różnych modelach eksperymentalnych wykazały, że ROS i RNS mogą indukować rozwój molekularnych anomalii, które prowadzą do rozwoju zaburzeń psychicznych, w tym depresji [30]. Ta wysoka wrażliwość mózgu na ROS i RNS w porównaniu do innych narządów wynika ze specyfiki tego organu. Wysokie zapotrzebowanie energetyczne mózgu sprawia że, jest on głównym konsumentem tlenu [31,32]. To podwyższone zużycie tlenu skutkuje zwiększoną produkcją ROS i RNS w mózgu [33]. Głównym celem działania ROS w mózgu są lipidy, zwłaszcza fosfolipidy, a ich nadmierna peroksydacja w mózgu jest ważnym wydarzeniem w patogenezie depresji [34-36]. Brak równowagi między produkcją ROS a ich neutralizacją przez systemy obrony antyoksydacyjnej prowadzi do uszkodzeń oksydacyjnych biomolekuł, a w konsekwencji skutkuje rozregulowaniem funkcji mózgu i zaburzeniami w sygnalizacji neuronalnej [37]. W związku z tym w tkance mózgowej obserwuje się procesy neurodegeneracyjne, w tym neuronalną degradację dopaminergiczną, dysfunkcję mitochondriów, ekscytotoksyczność oraz indukcję stanu zapalnego [38].

W związku z tym, że depresja dotyka przede wszystkim mózgu, badania wyjaśniające jej patomechanizm wymagają zastosowania modeli eksperymentalnych, umożliwiających obserwację zmian na dwóch poziomach – obwodowym (krew) i centralnym (mózg). Takie podejście pozwala zweryfikować na ile zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym są odzwierciedlane w zmianach we krwi chorych na depresję. Dlatego też wiele dotychczasowych badań dotyczących zaburzeń depresyjnych opierało się na zwierzęcych modelach, a także łączyło badania kliniczne z badaniami *post mortem* pacjentów chorych na depresję. W naszej do-



**Rycina 2.** Badanie przeprowadzono na samcach szczurów rasy Wistar Han (Charles River, Sulzfeld, Germany), które losowo podzielono na pięć grup (zwierzęta kontrolne, stresowane, kontrolne po terapii wenlafaksyną, stresowane po terapii solą fizjologiczną, stresowane po terapii wenlafaksyną) po sześć osobników każda. Przed rozpoczęciem właściwej ekspozycji na bodźce stresowe zwierzęta poddawano dwutygodniowej adaptacji do warunków laboratoryjnych. Procedura CMS polegała na długotrwałej ekspozycji zwierząt na łagodne bodźce stresowe, obejmujące pozbawienie zwierząt pokarmu lub wody, przechylenie klatki pod kątem 45°, zmiana dobowych rytmów oświetlenia pomieszczeń (włączanie i wyłączenie światła co dwie godziny), zabrudzenie klatki (250 ml wody w trocinowej ściółce) czy światło stroboskopowe (150 błysków/minutę). Bodźce stresowe stosowano indywidualnie i nieprzerwanie w dzień i w nocy. Zwierzęta kontrolne nie miały kontaktu z grupami stresowanymi. Po dwóch tygodniach ekspozycji na bodźce stresowe zwierzęta odpowiedniej grupy badawczej poddano terapii, która obejmowała iniekcje roztworu wenlafaksyny o stężeniu 10 mg/kg masy ciała lub soli fizjologicznej w ilości 1 ml/kg masy ciała. Terapia wenlafaksyną lub odpowiednio solą fizjologiczną trwała pięć tygodni [39]. Po zakończeniu procedury stresowej bądź terapii zwierzęta dekapitowano, a do dalszych analiz molekularnych (analiza ekspresji na poziomie mRNA z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją produktu specyficznego dla jednego allelu i/bądź drugiego allelu w czasie rzeczywistym (real-time PCR, ang. *real-time PCR*), ilości białka z zastosowaniem techniki Western Blot i stopnia metylacji regionów promotorowych wybranych genów z wykorzystaniem analizy topnienia DNA o wysokiej rozdzielczości (MS-HRM, ang. *methylation sensitive – high resolution melting*) pobierano próbki krwi obwodowej, z której pozyskiwano PBMCs i tkanki mózgowej z odpowiednio wypreparowanymi strukturami mózgu (hipokamp, ciało migdałowate, śródmózgowie, podwzgórze, kora mózgowa, jądra zwojów podstawy).

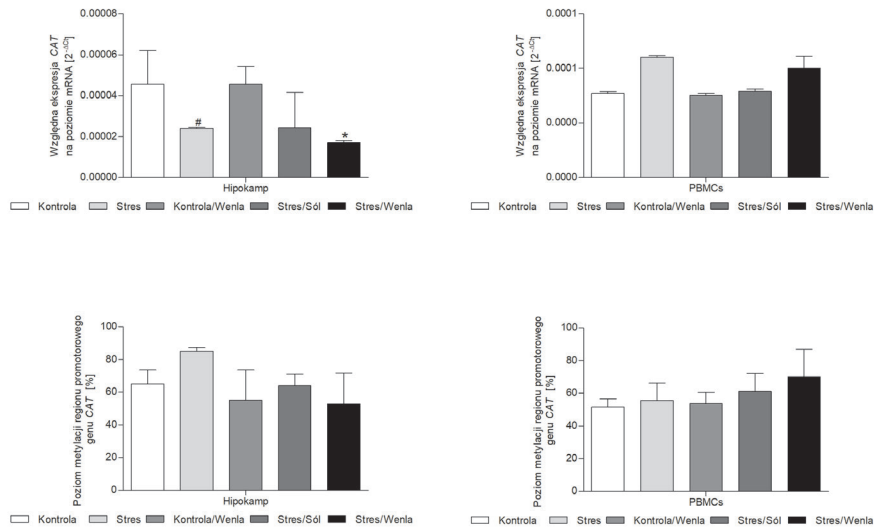
tychczasowej pracy badawczej wykorzystaliśmy dwa układy badawcze, obejmujące: (i) model *in vivo*, z wykorzystaniem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) oraz komórek nerwowych mózgu, pochodzących od szczurów (model depresji chronicznego łagodnego stresu, CMS, ang. *chronic mild stress*) (ii) oraz model *in vitro*, z wykorzystaniem próbek krwi, pobranej od pacjentów ze zdiagnozowaną depresją i zdrowych ochotników.

## ROLA STRESU OKSYDACYJNEGO I NITRACYJNEGO W PATOGENEZIE DEPRESJI NA PODSTAWIE BADAŃ *IN VIVO*

Zastosowanie zwierzęcego modelu depresji miało na celu identyfikację zmian zachodzących w tkance mózgowej i komórkach PBMCs na skutek ekspozycji na bodźce stresowe i

w odpowiedzi na standardową terapię przeciwdepresyjną z zastosowaniem wenlafaksyny (należącej do grupy SNRIs). Procedura CMS (schemat przebiegu zaprezentowano na Ryc. 2) została przeprowadzona w Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie dzięki współpracy z Panem Profesorem Mariuszem Pappem. Wszystkie badania zostały przeprowadzone na podstawie zgody Komisji Bioetycznej Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie nr 1272/2015.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że na skutek długotrwałych bodźców stresowych badane zwierzęta wykazywały zaburzenia behawioralne i molekularne. Dwutygodniowa procedura CMS przyczyniła się do rozwoju anhedonii u stresowanych szczurów, przejawiającej się istotnym spadkiem spożycia 1% roztworu sacharozy, któremu dodatkowo towarzyszyły zmiany ekspresji oraz stopnia metylacji

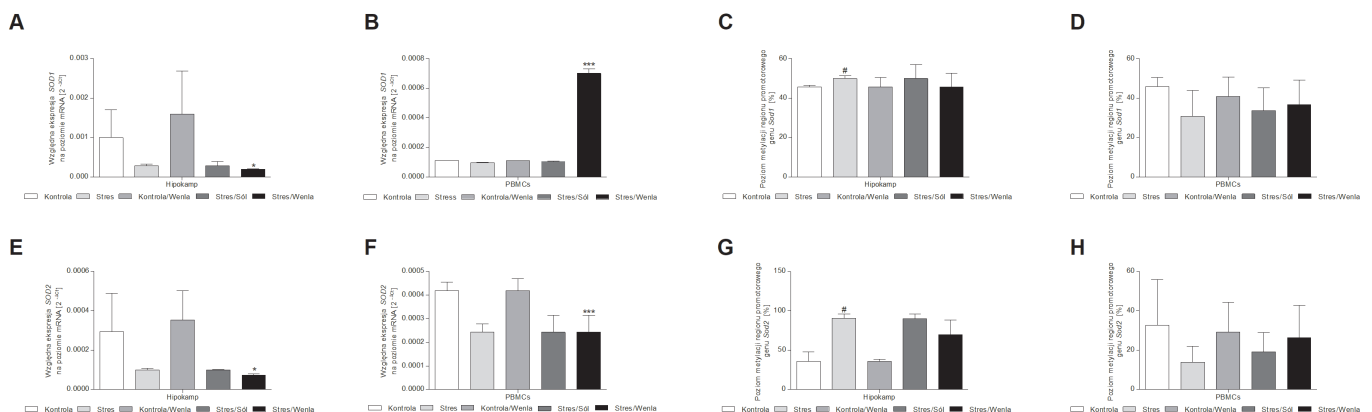


**Rycina 3.** Wpływ chronicznego łagodnego stresu i wenlafaksyny (10 mg/kg) na ekspresję *CAT* na poziomie mRNA w hipokampie (A) i PBMCs (B) oraz stopień metylacji regionu promotorowego badanego genu w hipokampie (C) i PBMCs (D). Poziom ekspresji oszacowany wg wzoru  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Dane w postaci średnia  $\pm$  SEM. N = 6. #  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a stresowaną; \*  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą stresowaną i grupą stresowaną po terapii wenlafaksyną (jednoczynnikowa ANOVA i test *post-hoc* Tukey).

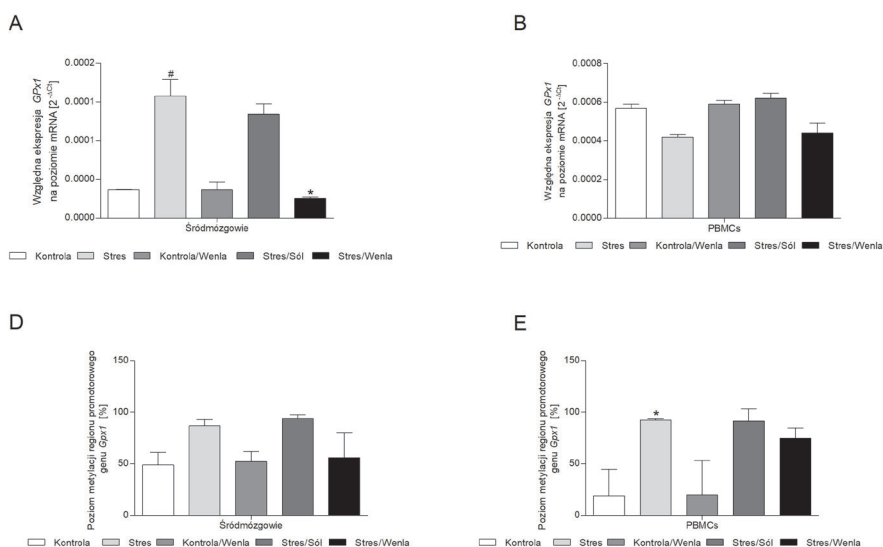
regionów promotorowych genów, kodujących enzymy zaangażowane w stres oksydacyjny i nitracyjny. Co więcej, pięcioletnioterapia wenlafaksyną przywracała spożycie sacharozy do poziomu osiąganego przez szczury grupy kontrolnej [40]. Z kolei na poziomie molekularnym, zaobserwowano, że ekspresja *CAT* (katalazy, ang. *catalase*) w hipokampie była obniżona u zwierząt poddanych procedurze CMS (Ryc. 3) [40], co potwierdziło wcześniejsze doniesienia, wskazujące, że przewlekły stres powoduje zmniejszenie aktywności katalazy w korze mózgu i hipokampie [41,42]. Ponadto, terapia escitalopramem (antydepresant z grupy SSRI) zwiększała aktywność *CAT* w mózgu szczurów poddanych chronicznemu, nieprzewidywalnemu, łagodnemu stresowi (CUMS, ang. *chronic unpredictable mild stress*) [43]. Analiza stopnia metylacji regionu promotorowego badanego genu nie wykazała istotnych różnic między badanymi grupami, zarówno w hipokampie

jak i w komórkach PBMCs, co może świadczyć o regulacji ekspresji genów na drodze innych niż metylacja mechanizmów epigenetycznych [40].

Nasze analizy wykazały również, że pięcioletnioterapia wenlafaksyną skutkowała wzrostem ekspresji *SOD1* i *SOD2* (dysmutazy ponadtlenkowej 1 i 2, ang. *superoxide dismutase 1/2*) w komórkach PBMCs stresowanych zwierząt, podczas gdy w hipokampie ta sama terapia wywoływała odwrotny efekt (Ryc. 4A, 4B, 4E, 4F). Co więcej, ekspozycja na bodźce stresowe skutkowała wzrostem metylacji regionów promotorowych *SOD1* i *SOD2* w hipokampie, co przekładało się na obniżenie poziomu ekspresji tych genów, ale w sposób nieistotny statystycznie (Ryc. 4C, 4D, 4G, 4H) [40]. Wcześniejsze badania z wykorzystaniem modelu CUMS wykazały, że stresowane zwierzęta cechowały się obniżoną aktywnością *SOD* w mózgu, która wzrastała na skutek



**Rycina 4.** Wpływ chronicznego łagodnego stresu i wenlafaksyny (10 mg/kg) na ekspresję *SOD1* na poziomie mRNA w hipokampie (A) i PBMCs (B) oraz stopień metylacji regionu promotorowego badanego genu w hipokampie (C) i PBMCs (D) oraz na ekspresję *SOD2* na poziomie mRNA w hipokampie (E) i PBMCs (F) oraz stopień metylacji regionu promotorowego badanego genu w hipokampie (G) i PBMCs (H). Poziom ekspresji oszacowany wg wzoru  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Dane w postaci średnia  $\pm$  SEM. N = 6. #  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a stresowaną; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  dla różnic pomiędzy grupą stresowaną i grupą stresowaną po terapii wenlafaksyną (jednoczynnikowa ANOVA i test *post-hoc* Tukey).

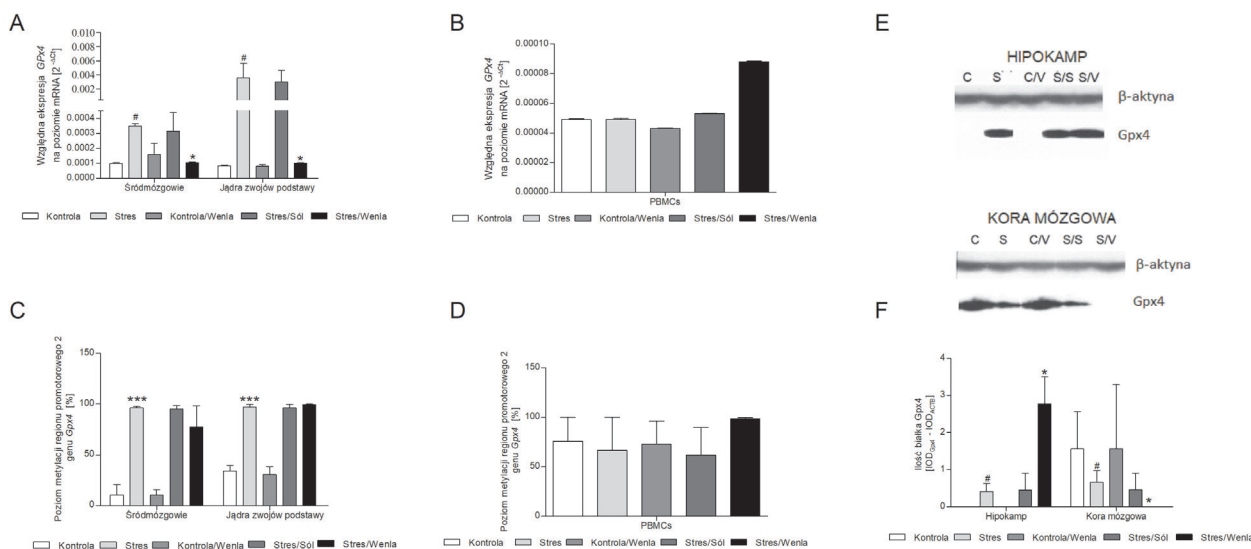


**Rycina 5.** Wpływ chronicznego łagodnego stresu i wenlafaksyny (10 mg/kg) na ekspresję *GPx1* na poziomie mRNA w śródmózgowiu (A) i PBMCs (B) oraz stopień metylacji regionu promotorowego badanego genu w śródmózgowiu (C) i PBMCs (D). Poziom ekspresji oszacowano wg wzoru  $2^{-\Delta Ct}$ . Dane w postaci średnia  $\pm$  SEM. N = 6. #  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a stresowaną; \*  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą stresowaną i grupą stresowaną po terapii wenlafaksyną (jednoczynnikowa ANOVA i test *post-hoc* Tukey).

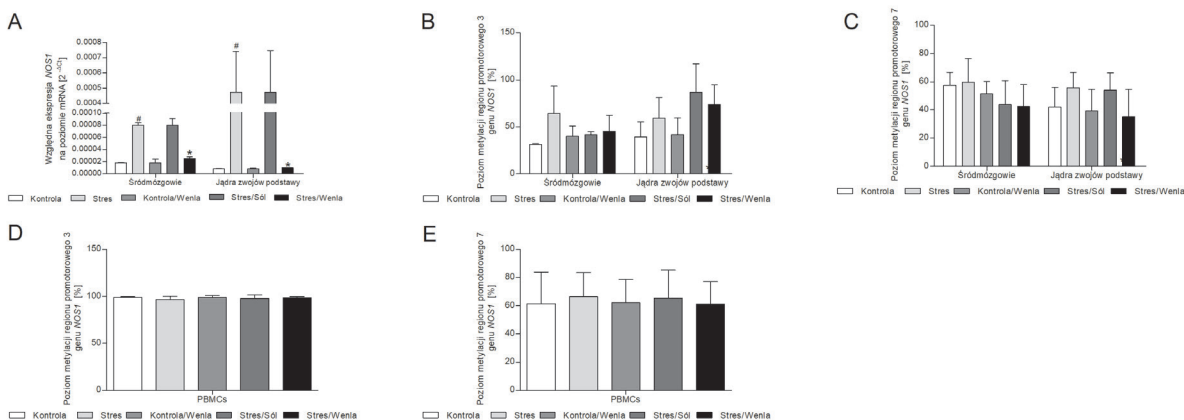
zastosowanego leczenia przeciwdepresyjnego escitalopramem [43]. Podobnie Berk i wsp. (2020) potwierdzili, że na skutek procedury CMS zwierzęta cechowały się obniżonym poziomem SOD w hipokampie, który po zastosowaniu imipraminy (antydepresant z grupy TCA) wzrastał [44].

Co więcej, przeprowadzone przez nas badania wykazały również, że dwutygodniowa procedura stresowa skutkowała wzrostem ekspresji na poziomie mRNA *GPx1* (peroksydazy glutationowej 1, ang. *glutathione peroxidase 1*) w śródmózgowiu (Ryc. 5A), a także *Gpx4* (peroksydazy glutationowej 4, ang. *glutathione peroxidase 4*) i *NOS1* (syntetazy tlenku azotu 1, ang.

*nitric oxide synthase 1*) w śródmózgowiu i jądrach zwojów podstawy (Ryc. 6A, 7A). Godnym uwagi jest fakt, że zastosowana terapia wenlafaksyną przywracała poziom ekspresji badanych genów do poziomu grupy kontrolnej (Ryc. 5A, 6A, 7A), co może sugerować, że w przypadku osobników cechujących się podwyższoną ekspresją *GPx1*, *GPx4* i *NOS1* wenlafaksyna może być skutecznym lekiem w łagodzeniu objawów depresji [40]. Podobnie, Wang i wsp. (2008) wykazali, że supresja *NOS* w neuronach hipokampu może chronić przed rozwojem objawów podobnych do depresji w zwierzęcym modelu depresji [45]. Co ważne, poziom ekspresji *GPx1* w komórkach PBMCs wykazywał odwrotną zależność niż w komórkach nerwo-



**Rycina 6.** Wpływ chronicznego łagodnego stresu i wenlafaksyny (10 mg/kg) na ekspresję *GPx4* na poziomie mRNA w śródmózgowiu, jądrach zwojów podstawy (A) i PBMCs (B) oraz stopień metylacji regionu promotorowego badanego genu w śródmózgowiu, jądrach zwojów podstawy (C) i PBMCs (D) jak również na ilość białka *Gpx4* w hipokampie i korze mózgowej (E, F). Ekspresję na poziomie mRNA oszacowano wg wzoru  $2^{-\Delta Ct}$ . W przypadku oznaczania ilości białka intensywność prążków na blonie rentgenowskiej badano densytometrycznie mierząc wartość IOD normalizowaną w porównaniu do genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny. Wyniki przedstawiono jako zależność  $IOD_{GPx4} / IOD_{\beta-aktyna}$ . Dane w postaci średnia  $\pm$  SEM. N = 6. #  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a stresowaną; \*  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą stresowaną i grupą stresowaną po terapii wenlafaksyną (jednoczynnikowa ANOVA i test *post-hoc* Tukey).



**Rycina 7.** Wpływ chronicznego łagodnego stresu i wenlafaksyny (10 mg/kg) na ekspresję NOS1 na poziomie mRNA w śródmózgowiu i jądrach zwojów podstawy (A) oraz stopień metylacji regionu promotorowego badanego genu w śródmózgowiu (B, C) i PBMCs (D, E). Poziom ekspresji oszacowany wg wzoru  $2^{-\Delta CT}$ . Dane w postaci średnia  $\pm$  SEM.  $N = 6$ . #  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a stresowaną; \*  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą stresowaną i grupą stresowaną po terapii wenlafaksyną (jednoczynnikowa ANOVA i test *post-hoc* Tukey).

wych, ale uzyskane wyniki okazały się być nieistotne statystycznie (Ryc. 5B). Z kolei analiza stopnia metylacji regionu promotorowego *Gpx1* wykazała, że zmiany w śródmózgowiu były odzwierciedlone w PBMCs, ale istotne podwyższenie stopnia metylacji zaobserwowano tylko dla komórek PBMCs szczurów poddanych procedurze stresowej (Ryc. 5C, 5D). Ponadto, mimo zwiększonej ekspresji *Gpx4* w śródmózgowiu i jądrach zwojów podstawy, nasze badania wykazały, że stopień metylacji regionów promotorowych badanego genu był wyższy w grupie poddanej procedurze stresowej niż w grupie kontrolnej (Ryc. 5C) [40]. Ten brak wpływu podwyższonej metylacji na ekspresję może być konsekwencją obecności wielu regionów promotorowych w badanym genie, które mogą regulować jego ekspresję na drodze innych mechanizmów, np. takich jak acetylacja histonów czy miRNA [46]. Istotne zmiany w ilości białka zaobserwowano dla *Gpx4* w hipokampie i korze mózgowej, jednak zmiany te nie są synonimiczne (Ryc. 5E, 5F). W hipokampie zaobserwowano wzrost ilości *Gpx4* w grupie stresowej w porównaniu do grupy kontrolnej, a terapia wenlafaksyną powodowała dalszy wzrost ilości białka (Ryc. 5E), podczas gdy w korze mózgowej zaobserwowano przeciwny efekt w obu omawianych grupach badawczych (Ryc. 5F). Wyniki te mogą świadczyć o specyficzności strukturalnej badanych parametrów. Co ważne, w przypadku PBMCs nie zaobserwowaliśmy istotnych różnic w ekspresji (Ryc. 6B) i stopniu metylacji promotora *Gpx4* (Ryc. 6D) oraz metylacji regionów promotorowych NOS1 (Ryc. 7D, 7E) [40], co sugeruje, że zmiany zachodzące centralnie – w mózgu – nie są dokładnym odzwierciedleniem zmian obserwowanych obwodowo, bądź też zmiany na obwodzie są obserwowane ze znacznym opóźnieniem w porównaniu do zmian zachodzących w tkance mózgowej. Dodatkowo, istotność zmian obserwowanych w mózgu może wynikać z większej wrażliwości komórek nerwowych nawet na małe stężenia ROS [47].

## ROLA STRESU OKSYDACYJNEGO I NITRACYJNEGO W PATOGENEZIE DEPRESJI NA PODSTAWIE BADAŃ KLINICZNYCH

Weryfikacją badań prowadzonych na zwierzęcych modelach depresji powinny być odpowiednie badania z udziałem

ludzi, w tym również badania przeprowadzane *post mortem*. Jak wspomniano powyżej, mózg jest organem szczególnie narażonym na szkodliwe działanie ROS. W związku z tym, dotychczasowe badania potwierdziły podwyższony poziom biomarkerów uszkodzeń oksydacyjnych biomolekuł komórkowych (białek, lipidów i kwasów nukleinowych). Pacjenci z depresją odznaczali się podwyższonym poziomem 8-oksoguaniny (8-oxoG, ang. *8-oxoguanine*) w moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym, osoczu i PBMCs, co potwierdza obecność uszkodzeń oksydacyjnych DNA [48-50]. Co więcej, w przebiegu depresji zaobserwowano również podwyższony poziom malonyldialdehydu (MDA, ang. *malondialdehyde*), produktu ubocznego peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz 8-izo-prostaglandyny F2 (8-iso-PGF2, ang. *8-iso-prostaglandin F2*), która powstaje w wyniku utleniania kwasu arachidonowego [51-53].

Obok nadmiernej produkcji ROS w przebiegu depresji obserwuje się również niewydolność systemów obrony antyoksydacyjnej. Dotychczas wykazano, że pacjenci z depresją cechują się obniżonym poziomem niskocząsteczkowych antyoksydantów, w tym cynku, koenzymu Q10, witamin A, E, C oraz glutationu w osoczu oraz zwiększoną aktywnością enzymów prooksydacyjnych, takich jak oksydaza ksantynowa [55-57]. Niestety, wiele z uzyskanych wyników dotychczasowych badań pozostaje sprzecznych, szczególnie w przypadku badań dotyczących analizy aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Z jednej strony naukowcy potwierdzają zmniejszoną aktywność SOD czy GPx w surowicy chorych [58,59], a z drugiej strony istnieją dowody przeczące tym wynikom [54-56]. Podobnie w przypadku CAT, wiele badań klinicznych wykazało wzrost aktywności badanego enzymu w trakcie epizodu depresji oraz w przewlekłych stanach depresyjnych [58,60-62]. Ta zwiększona aktywność CAT i innych enzymów antyoksydacyjnych może wynikać z aktywacji mechanizmów kompensacyjnych ukierunkowanych na złagodzenie wpływu stresu oksydacyjnego. Jednak z drugiej strony inne badania wskazują na istotny spadek aktywności CAT podczas epizodów depresji, co może być konsekwencją skrajnego wyczerpania enzymów przy bardzo wysokim poziomie ROS w

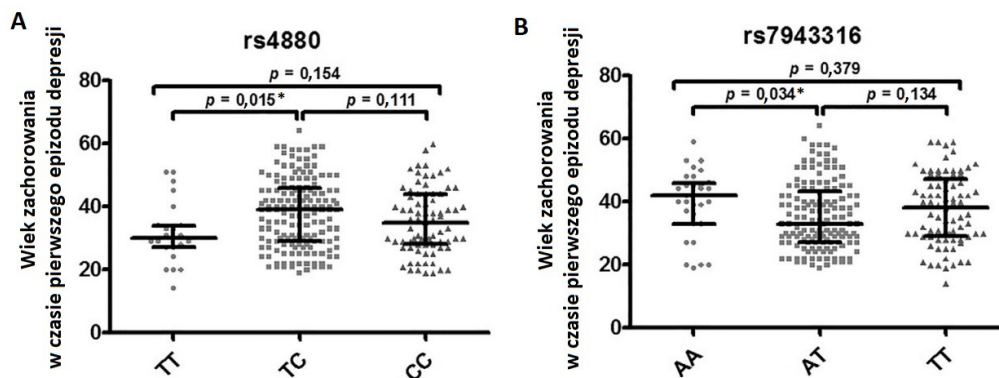
**Tabela 1.** Rozkład genotypów i alleli polimorfizmów c.47T > C, c.-89A >T, c.660T > C i częstość występowania depresji.

Genotyp/ allel	Grupa kontrolna (n = 229)		Pacjenci z depresją (n = 281)		Crude OR (95% CI) <sup>a</sup>	P	Skorygowane OR (95% CI) <sup>a</sup>	P
<b>c.47T &gt; C (p.Val16Ala) – SOD2 (rs4880)</b>								
T/T	9	0,039	29	0,103	<b>2,524</b> (1,308–6,096)	0,008	<b>2,823 (1,308–6,095)</b>	0,008
T/C	150	0,655	170	0,605	0,814 (0,566–1,170)	0,266	0,814 (0,565–1,172)	0,268
C/C	70	0,306	82	0,292	0,814 (0,566–1,170)	0,687	0,922 (0,629–1,353)	0,679
$\chi^2 = 2,551; p = 0,110$								
T	169	0,367	228	0,406	1,286 (0,943–1,753)	0,111	1,289 (0,945–1,759)	0,109
C	290	0,633	334	0,594	0,778 (0,570–1,060)	0,111	0,776 (0,569–1,058)	0,109
<b>c.-89A &gt;T– CAT (rs7943316)</b>								
A/A	42	0,183	33	0,117	0,595 (0,363–0,975)	0,039	<b>0,595 (0,363–0,975)</b>	0,039
A/T	98	0,428	160	0,569	1,757 (1,234–2,499)	0,002	<b>1,762 (1,236–2,511)</b>	0,002
T/T	89	0,389	88	0,313	0,721 (0,500–1,040)	0,080	0,720 (0,498–1,041)	0,080
$\chi^2 = 0,0215; p = 0,883$								
A	182	0,397	226	0,402	1,020 (0,787–1,321)	0,883	1,019 (0,786–1,321)	0,888
T	276	0,603	336	0,598	0,981 (0,757–1,271)	0,883	0,982 (0,757–1,272)	0,888
<b>c.660T &gt; C – GPx4 (rs713041)</b>								
T/T	8	0,035	53	0,189	<b>6,450 (2,998–</b> <b>13,877)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>6,463 (3,003–</b> <b>13,907)</b>	<b>&lt;0,001</b>
T/C	138	0,603	141	0,603	0,659 (0,463–0,939)	0,021	<b>0,659 (0,463–0,939)</b>	0,021
C/C	83	0,362	87	0,310	0,793 (0,548–1,148)	0,219	0,791 (0,546–1,145)	0,214
$\chi^2 = 13,280; p < 0,001$								
T	154	0,336	247	0,440	1,678 (1,264–2,226)	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,684 (1,268–2,237)</b>	<b>&lt;0,001</b>
C	304	0,664	315	0,560	0,596 (0,449–0,791)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,594 (0,447–0,788)</b>	<b>&lt;0,001</b>

*p* < 0,05 wraz z odpowiednimi ORs są pogrubione. <sup>a</sup>OR dostosowany do płci.

trakcie przedłużającego się lub kolejnych epizodów depresji [63]. Próba rozstrzygnięcia niejasności dotyczących udziału stresu oksydacyjnego w rozwoju depresji była wykonana przez nas analiza częstości występowania określonych wariantów polimorficznych (SNPs, ang. *single nucleotide polymorphisms*) CAT, SOD2 i GPx4 (Tab. 1). Materiał do badań obejmował DNA wyizolowany z próbek krwi obwodowej pobranej od zdrowych ochotników, należących do grupy kontrolnej oraz od pacjentów ze zdiagnozowaną depresją, hospitalizowanych w Klinice Psychiatrii Dorosłych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Próbki te otrzymano dzięki współpracy z zespołem Pana Profesora Piotra Gałęckiego. Rozkład genotypów i alleli badanych SNPs przeprowadzono z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją produktu specyficznego dla jednego allelu i/bądź drugiego allelu w czasie rzeczywistym (*real-time PCR* ang. *real-time polymerase chain reaction*). Na wykonanie tej części badań została udzielona zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/70/14/KE. Analiza rozkładu genotypów wykazała, że genotyp T/T polimorfizmu c.47T>C (rs4880) genu SOD2 był związany z większą

częstością występowania depresji. W przypadku polimorfizmu c.-89A>T (rs7943316) genu CAT, wykazano, że genotyp A/A jest pozytywnie skorelowany z występowaniem depresji, podczas gdy genotyp A/T znacznie częściej występował w grupie kontrolnej. Ponadto, genotyp T/T polimorfizmu c.660T>C (rs713041) genu GPx4 był związany ze zwiększoną częstością występowania depresji, podczas gdy heterozygota T/C oraz allel C wykazywały odwrotną zależność [64]. Dodatkowo, w związku z tym, że kobiety cechują się dwukrotnie wyższym ryzykiem rozwoju depresji niż mężczyźni, [3] wykonano analizę rozkładu genotypów badanych polimorfizmów z uwzględnieniem płci, która potwierdziła różnice między populacją kobiet i mężczyzn. W przypadku polimorfizmu c.47T>C (p.Val16Ala) genu SOD2 (rs4880), genotyp T/T występował znacznie częściej u mężczyzn z depresją, podczas gdy w populacji kobiet nie obserwowano wpływu badanego polimorfizmu na częstość występowania depresji. Genotyp A/A polimorfizmu c.89A>T genu CAT (rs7943316) u mężczyzn, a genotypy A/T i T/T u kobiet były związane ze zmniejszeniem częstości występowania depresji. W przypadku polimorfizmu c.660T>C

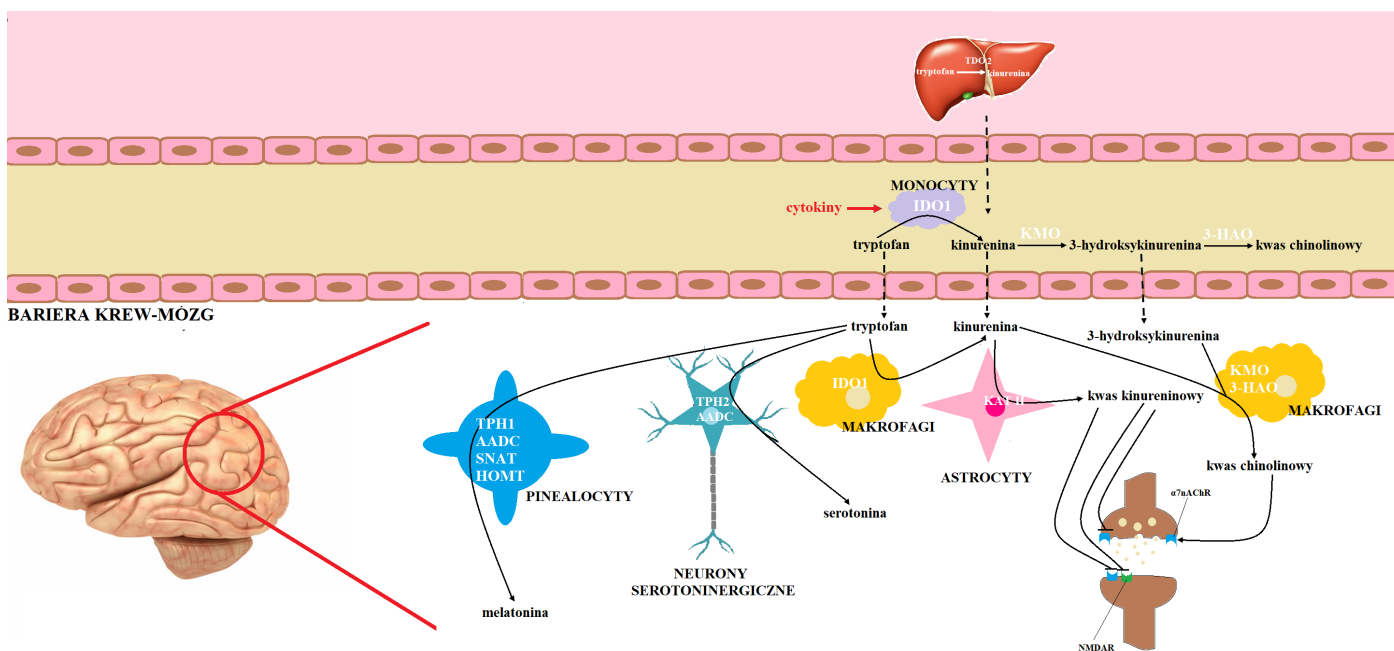


Rycina 8. Wpływ genotypów polimorfizmów c.47T>C (p.Val16Ala) – *SOD2* (rs4880) (A) oraz c.-89A>T – *CAT* (rs7943316) (B) na wiek pacjenta podczas pierwszego epizodu depresji. \*  $p < 0,05$

(rs713041) genu *GPx4* genotyp T/T był pozytywnie skorelowany z występowaniem depresji zarówno w populacji kobiet jak i mężczyzn, jednakże heterozygota T/C tego SNP była związana ze wzrostem częstości depresji tylko w grupie mężczyzn. Co istotne, analiza wieku pierwszego epizodu depresji wykazała, że homozygoty T/T polimorfizmu c.47T>C (p.Val16Ala) zlokalizowanego w genie *SOD2* oraz heterozygoty polimorfizmu c.-89A >T – *CAT* doświadczały pierwszego epizodu depresji w młodszy wieku niż odpowiednio heterozygoty T/C (dla c.47T>C (p.Val16Ala)

i homozygoty A/A (dla c.-89A >T – *CAT*) (Ryc. 8). Analizy nie wykazały wpływu polimorfizmów na odpowiedź na zastosowaną terapię lekami z grupy SSRIs [64].

Ważne dla prawidłowego funkcjonowania komórki są również RNS, takie jak tlenek azotu (NO, ang. *nitric oxide*), kation nitrozylowy (NO<sup>+</sup>, ang. *nitrosyl cation*), anion nitrozylowy (NO<sup>-</sup>, ang. *nitrosyl anion*) i nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>, ang. *peroxynitrite*) [65]. Nadprodukcja RNS prowadzi do rozwoju stresu nitracyjnego, który również jest zaangażowany



Rycina 9. Metabolizm tryptofanu w organizmie. 2,3-dioksygenazy tryptofanu 2 (TDO2, ang. *tryptophan 2,3-dioxygenase*) oraz 2,3-dioksygenazy indolaminowej 1 (IDO1, ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase 1*) katalizują rozszczepienie pierścienia indolowego tryptofanu (egzogeny aminokwas) z jednoczesnym przyłączeniem atomu tlenu w pozycji 2 i 3, prowadząc finalnie do powstania kinureniny. IDO2 wykazuje najwyższą ekspresję w wątrobie, a IDO1 ulega ekspresji w większości tkanek, w tym w komórkach ośrodkowego układu nerwowego. W następnym etapie kinurenina jest przekształcana do 3-hydroksykinureniny dzięki aktywności 3-monooksygenazy kinureninowej (KMO, ang. *kynurenine 3-monooxygenase*), a 3-hydroksykinurenina jest przekształcana do silnie toksycznego kwasu chinolinowego. Tryptofan, kinurenina i 3-hydroksykinurenina mogą przenikać przez barierę krew-mózg. W mózgu, tryptofan ulega przemianom prowadzącym do powstania melatoniny (dzięki aktywności hydroksylazy tryptofanu 1 – TPH1, ang. *tryptophan hydroxylase 1*; dekarboksylazy aromatycznych L-aminokwasów – AADC, KATI, ang. *aromatic L-amino acid decarboxylase* lub *kynurenine aminotransferase I*; N-acetylotransferazy serotoniny – SNAT, ang. *serotonin N-acetyltransferase*; 5-hydroksyindolo-O-metylotransferazy – HMT, ang. *hydroxyindole-O-methyltransferase*), serotoniny (dzięki aktywności hydroksylazy tryptofanu 2 – TPH2, ang. *tryptophan hydroxylase 2*; dekarboksylazy aromatycznych L-aminokwasów – AADC, KATI), kwasu kinureninowego (dzięki aktywności aminotransferazy kinureniny II – KATII, ang. *kynurenine aminotransferase II*) i kwasu chinolinowego (dzięki aktywności KMO, 3,4-dioksygenazy kwasu antranilowego – 3-HAO, ang. *3-hydroxyanthranilate oxidase*). Kwas kinureninowy wykazuje aktywność antagonisty receptora N-metylo-D-asparaginy (NMDAR, ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*) i receptora  $\alpha 7$  nikotynowych receptorów cholinergicznyc (7nAChR, ang. *alpha-7 nicotinic receptor*), podczas gdy kwas chinolinowy aktywuje receptor  $\alpha 7$ nAChR [70].



zowany w patofizjologię depresji. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że obok podwyższonego stężenia ROS, pacjenci z depresją cechują się również nadprodukcją RNS. W przebiegu depresji obserwuje się podwyższony poziom NO. Co więcej, pacjenci po próbach suicydalnych cechowali się wyższym poziomem NO w surowicy niż pacjenci, którzy nie dokonywali tych prób [66-68]. Ponadto, konsekwencją zbyt wysokiego stężenia NO może być nitrowanie i hipernitrozylacja aminokwasów i białek. Prowadzi to do produkcji reaktywnych związków, w tym NO-tyrozyny, NO-tryptofanu i NO-argininy. Z drugiej strony udowodniono, że ograniczenie syntezy NO może wykazywać działanie o charakterze antydepresyjnym [29,69]. Jednakże dokonane przez nas analizy wariantów polimorficznych 420-34221G>A (rs1879417) genu *NOS1*, c.1823C> T (rs2297518) i c.-227G>C (rs10459953) genu *NOS2* nie wykazały korelacji między rozkładem ich genotypów/alleli a zmianą częstości występowania depresji w ogólnej populacji. Jednakże analiza z uwzględnieniem płci wykazała, że w grupie kobiet genotyp G/C polimorfizmu c.227G>C genu *NOS2* (rs10459953) był związany ze zmniejszeniem częstości występowania depresji, podczas gdy genotyp G/G tego SNP wykazywał odwrotny związek. W populacji mężczyzn nie zaobserwowano wpływu badanego polimorfizmu na częstość występowania depresji, co może potwierdzać większe ryzyko rozwoju depresji u kobiet [64].

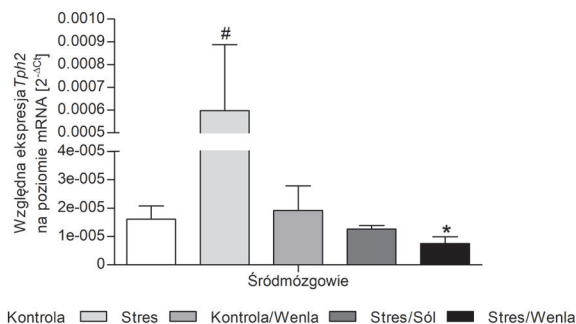
#### ROLA NIEPRAWIDŁOWEGO PRZEBIEGU SZLAKU KATABOLITÓW TRYPTOFANU W ROZWOJU DEPRESJI

Tryptofan jest egzogennym aminokwasem, prekursorem serotoniny, którego bogatym źródłem są pestki dyni, ser żółty, pestki słonecznika, mięso wieprzowe i siemię lniane. Przemiany szlaku TRYCATs zaprezentowano na Ryc. 9.

Dotychczasowe badania nad rolą szlaku TRYCATs w rozwoju depresji były skoncentrowane przede wszystkim na analizach poziomu serotoniny i ilości jej receptorów, co zaowocowało opracowaniem w latach 60. XX wieku teorii serotoninowej, wyjaśniającej mechanizm rozwoju depresji. Jednak późniejsze badania wykazały, że nie tylko etapy tworzenia serotoniny są kluczowe w mechanizmie rozwoju depresji, ale cały szlak TRYCATs, począwszy od niedoboru tryptofanu poprzez nieprawidłowości przebiegu szlaku kinureninowego oraz syntezy monoamin, zarówno serotoniny jak i melatoniny [71,72]. W związku z tym nasze badania objęły analizę molekularnych zaburzeń enzymów zaangażowanych w szlak metabolizmu tryptofanu na podstawie zwierzęcego modelu CMS oraz wpływu SNPs, zlokalizowanych w genach, kodujących enzymy szlaku TRYCATs na częstość występowania depresji w ogólnej populacji.

#### ROLA NIEPRAWIDŁOWOŚCI SZLAKU TRYCATS W PATOGENEZIE DEPRESJI NA PODSTAWIE BADAŃ *IN VIVO*

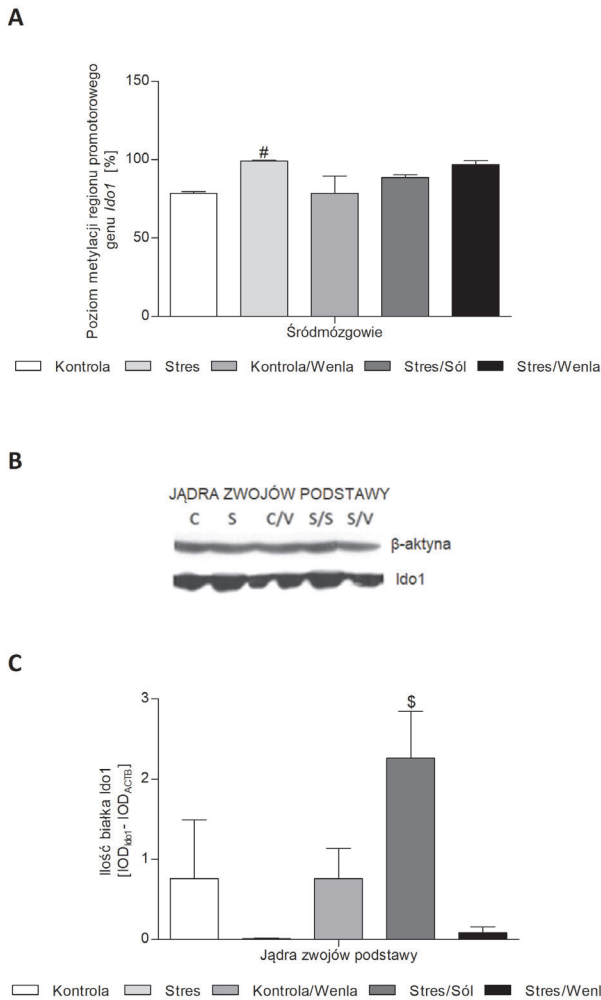
Rozwój depresji jest związany z obniżonym poziomem tryptofanu, który z jednej strony może być konsekwencją przyjmowania diety ubogiej w tryptofan, a z drugiej może wynikać z nadmiernej aktywności enzymów metabolizujących tryptofan, w tym hydroksylaz tryptofanu, limitujących szybkość syntezy serotoniny i metioniny [73]. Badania na



**Rycina 10.** Wpływ chronicznego łagodnego stresu i wenlafaksyny (10 mg/kg) na ekspresję *Tph2* na poziomie mRNA w śródmózgowiu. Poziom ekspresji oszacowany wg wzoru  $2^{-\Delta C_t}$ . Dane w postaci średnia  $\pm$  SEM. N = 6. #  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a stresowaną; \*  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą stresowaną i grupą stresowaną po terapii wenlafaksyną (jednoczynnikowa ANOVA i test *post-hoc* Tukey).

zwierzętach wykazały, że stresowane zwierzęta cechowały się zmniejszonym poziomem ekspresji mRNA genów *Tph1* i *Tph2*, które limitują szybkość syntezy serotoniny [74]. Jiao i wsp. (2019) wykazali, że przewlekły stres związany z unieruchomieniem (CIS, ang. *chronic immobilization stress*) zwiększał ekspresję *Tph2* i ilość kodowanego przez niego białka w hipokampie, podczas gdy fluoksetyna (antydepresant z grupy SSRI) normalizowała te efekty [75]. Podobnie nasze badania z udziałem zwierząt wykazały, że podwyższony poziom ekspresji *Tph2* w śródmózgowiu stresowanych zwierząt (procedura CMS) ulegał normalizacji po podaniu wenlafaksyny (Ryc. 10). Godnym uwagi jest fakt, iż ani procedura CMS, ani terapia wenlafaksyną nie wpływały istotnie na zmiany poziomu ekspresji badanych genów w komórkach PBMCs, co może sugerować, że zaburzenia przebiegu szlaku TRYCATs są specyficzne dla mózgu [76].

Dotychczasowe badania wykazały, że deficyt tryptofanu może być również związany z podwyższonym poziomem Ido1. Ponadto, w wyniku aktywności tego enzymu generowane są neurotoksyczne metabolity, w tym 3-hydroksykinurenina i kwas chinolinowy. Te szkodliwe produkty metabolizmu tryptofanu dodatkowo wzmagają stres oksydacyjny, który w konsekwencji może prowadzić do indukcji apoptozy neuronów [77]. Apoptoza komórek nerwowych została potwierdzona w badaniach klinicznych donoszących, że objętość hipokampu i ciała migdałowatego jest zmniejszona u pacjentów z depresją [78]. Ponadto, wysoka ekspresja białka Ido1 może przyczyniać się do hamowania produkcji serotoniny, której niski poziom jest charakterystyczny dla pacjentów z depresją [79,80]. Dwutygodniowa procedura stresowa CMS powodowała wzrost ekspresji *Ido1* w śródmózgowiu (Ryc. 11A). Co więcej, nasze wyniki potwierdzają również, że skuteczna terapia przeciwdepresyjna wenlafaksyną może znosić toksyczny efekt działania badanego enzymu, w celu przywrócenia prawidłowego metabolizmu tryptofanu poprzez obniżanie ilości białka Ido1 w neuronach jąder zwojów podstawy (Ryc. 11B, 11C) [76]. Podobnie, Jiao i wsp. (2019) stwierdzili, że CIS zwiększa poziom ekspresji mRNA i białek Ido1 w hipokampie, a efekty te normalizuje fluoksetyna (antydepresant z grupy SSRI) [75]. Terapia citalopramem (antydepresant z grupy

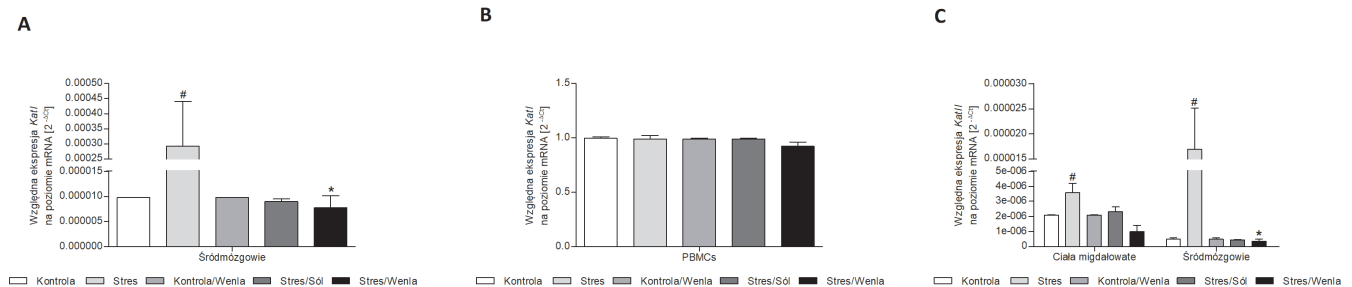


**Rycina 11.** Wpływ chronicznego łagodnego stresu i wenlafaksyny (10 mg/kg) na stopień metylacji regionu promotorowego *Ido1* w śródmózgowiu (A) oraz na ilość białka Ido1 w jądrach zwojów podstawy (B, C). W przypadku oznaczania ilości białka intensywność prążków na błonie rentgenowskiej badano densytometrycznie mierząc wartość IOD normalizowaną w porównaniu do genu referencyjnego β-aktyny. Wyniki przedstawiono jako zależność IOD<sub>Ido1</sub>/IOD<sub>β-aktyna</sub>. Dane w postaci średnia ± SEM. N = 6. #  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a stresowaną; \$  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą stresowaną po terapii solą fizjologiczną i grupą stresowaną po terapii wenlafaksyną (jednoczynnikowa ANOVA i test *post-hoc* Tukey).

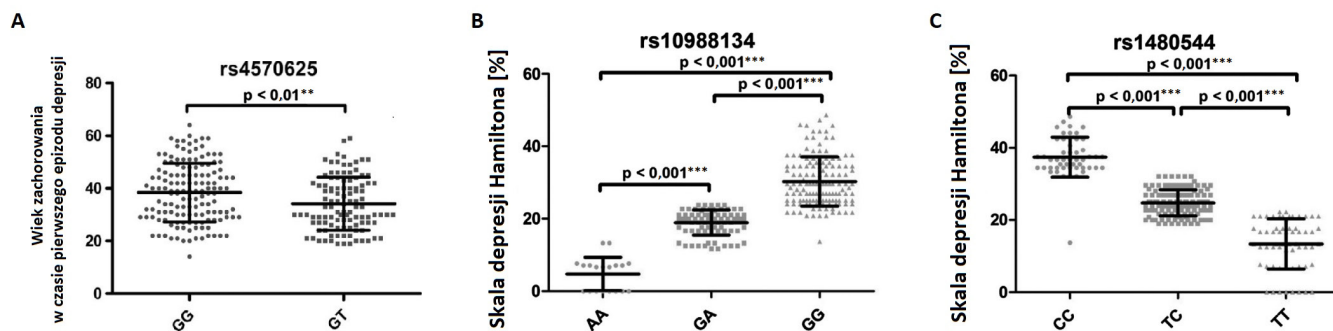
SSRIs) z kolei hamowała aktywność Ido1, przyczyniając się tym samym do zwiększenia obrotu serotoniny w hipokampie, ciele migdałowatym i podwzgórzu zestresowanych

szczurów [81]. Podobny efekt związany ze złagodzeniem objawów depresyjnych zaobserwowano w grupie zwierząt, którym podawano inhibitory Ido1 oraz u myszy z nokautem *Ido1* [82-85]. Wyniki te mogą wskazywać na zdolność terapii przeciwdepresyjnej do modulowania ekspresji enzymów zaangażowanych w szlak TRYCATs, a w szczególności badane leki przeciwdepresyjne z grup SSRIs i SNRIs mogą ograniczać produkcję kinureny, a tym samym obniżyć poziom szkodliwych metabolitów i hamować procesy neurodegeneracyjne związane z rozwojem depresji.

Z jednej strony rozwój depresji wiąże się z nadprodukcją neurotoksycznych produktów metabolizmu tryptofanu, a z drugiej ze zmniejszonym poziomem kwasu kinureninowego o charakterze neuroprotektynym [73]. Istniejąca koncepcja neurotoksyczności aminokwasów pobudzających w mózgu zaproponowana przez Olney i wsp. (1995), zakłada udział nadmiernego pobudzenia NMDAR przez agonistę, np. kwas glutaminowy, w patogenezie różnych form uszkodzenia komórki nerwowej [86]. Jednym z agonistów tego receptora może być również kwas chinolinowy, który w nadmiernych ilościach prowadzi do niedoczynności interneuronów GABAergicznymi i indukcji apoptozy neuronów, co w konsekwencji może odpowiadać za rozwój objawów charakterystycznych dla depresji. Co więcej, kwas chinolinowy zwiększa również presynaptyczne uwalnianie glutaminianu i zmniejsza jego wychwyt przez astrocyty, co dodatkowo wymaga pobudzenie receptorów NMDAR i skutkuje ekscytotoksycznością. Z kolei kwas kinureninowy działa jako antagonist receptorów NMDAR, a tym samym znosi efekt działania kwasu chinolinowego [87,88]. Dotychczasowe wyniki wykazały, że myszy poddane procedurze CUMS wykazują obniżony poziom kwasu kinureninowego, świadczący o niskim poziomie lub aktywności Kat w ciałach migdałowatych i prążkowie [89]. Jednakże w naszym badaniu to dwutygodniowa ekspozycja na bodźce stresowe powodowała wzrost ekspresji *Katl* w śródmózgowiu, co może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów kompensacyjnych na początkowym etapie rozwoju depresji mających na celu zneutralizowanie toksycznego działania kwasu chinolinowego (Ryc. 12A). Przedłużający się epizod depresji lub każdy kolejny epizod prowadzą do wyczerpania mechanizmów kompensacyjnych, a w konsekwencji skutkują wyczerpaniem kwasu kinureninowego. Co więcej, w komórkach PBMCs nie odnotowano znaczących różnic w poziomie ekspresji *Katl* między wszystkimi badanymi grupami, co może świadczyć, że część zmian na poziomie



**Rycina 12.** Wpływ chronicznego łagodnego stresu i wenlafaksyny (10 mg/kg) na ekspresję *Katl* na poziomie mRNA w śródmózgowiu (A) i PBMCs (B) oraz *Katl* w ciałach migdałowatych i śródmózgowiu (C). Poziom ekspresji oszacowany wg wzoru  $2^{-\Delta Ct}$ . Dane w postaci średnia ± SEM. N = 6. #  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a stresowaną; \*  $p < 0,05$  dla różnic pomiędzy grupą stresowaną i grupą stresowaną po terapii wenlafaksyną (jednoczynnikowa ANOVA i test *post-hoc* Tukey).



Rycina 13. Wpływ genotypów polimorfizmu c.-844G>T - *TPH2* (rs4570625) na wiek pacjenta podczas pierwszego epizodu depresji oraz polimorfizmów c.\*456G>A - *KATI* (rs10988134) i c.975-7T>C (rs1480544) genu *KATII* na skuteczność terapii lekami SSRI. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

molekularnym w rozwoju depresji jest charakterystyczna jedynie dla komórek nerwowych bądź zmiany obwodowe (w komórkach PBMCs) są obserwowane z dużym opóźnieniem w stosunku do zmian w ośrodkowym układzie nerwowym (Ryc. 12B). Ponadto, w ciałach migdałowatych i śródmózgowiu stresowanych zwierząt zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji *KatIII*, który ulegał obniżeniu do poziomu grupy kontrolnej po zastosowaniu terapii wenlafaksyną (Ryc. 12C). Ekspresja *KatIII* w komórkach PBMCs pozostawała na niewykrywalnym poziomie [76]. Nasze wyniki, choć sprzeczne z dotychczasowymi danymi, mogą być konsekwencją uruchomienia mechanizmów obronnych w postaci zwiększonej ekspresji enzymów Kats, mających na celu zniesienie zwiększonego stężenia kwasu chinolinowego poprzez indukcję produkcji kwasu kinureninowego.

#### ROLA NIEPRAWIDŁOWOŚCI SZLAKU KATABOLITÓW TRYPTOFANU W PATOGENEZIE DEPRESJI NA PODSTAWIE BADAŃ KLINICZNYCH

Badania kliniczne również potwierdzają rolę zaburzeń przemian tryptofanu w patogenezie depresji. Maes i wsp. (2011a,b) wykazali, że pacjenci z depresją charakteryzują się obniżonym stężeniem tryptofanu i kwasu kinureninowego, wykazującego właściwości neuroprotektcyjne, a podwyższonym stężeniem neurotoksycznych produktów ubocznych przemian tryptofanu, takich jak 3-hydroksykinurenina i kwas chinolinowy [90,91]. Obok zaburzeń prawidłowych poziomów metabolitów szlaku TRYCATs zaobserwowano zmiany dotyczące enzymów, zaangażowanych w przemiany tryptofanu. Rozwój depresji może być związany z obniżeniem aktywności enzymów zaangażowanych w produkcję kwasu kinureninowego o właściwościach przeciwutleniających i neuroprotektyjnych, KATI i II [77,92]. Jak zauważono powyżej, przemiany tryptofanu są związane z syntezą melatoniny, która jest zaangażowana w regulację rytmów okołodobowych człowieka. Niski poziom tryptofanu obserwowany u pacjentów z depresją wiąże się ze zmniejszoną syntezą melatoniny, a tym samym przyczynia się do rozwoju bezsenności u pacjentów z depresją. 80% pacjentów ze zdiagnozowaną depresją charakteryzuje się zaburzeniami snu. Niestety, nasilająca się bezsenność może przyczynić się do ryzyka nawrotu i zwiększenia ciężkości przebiegu epizodu depresji. Ponadto, wykazano, że bezsenność jest charakterystyczna dla osób, które podejmowały

próby samobójcze. Nieleczona bezsenność może być również przyczyną nawrotu pełnoobjawowej depresji [93].

Przeprowadzone przez nas badania skoncentrowały się na poszukiwaniu skutecznych biomarkerów diagnostycznych wśród polimorfizmów zlokalizowanych w genach *TPH1*, *TPH2*, *IDO1*, *KATI*, *KATII* [94,95]. Wśród badanych polimorfizmów, genotyp C/C oraz allel C polimorfizmu c. 804-7C>A (rs1799913), homozygota A/A polimorfizmu c. 803+221C>A (rs1800532), genotypy T/G oraz genotyp T/T i allel T polimorfizmu c.-173A>T (rs10488682), zlokalizowanych w genie *TPH1* były związane ze zwiększoną częstością występowania depresji. Z kolei genotyp T/T polimorfizmu c.-1668T>A (rs623580) genu *TPH1* był ujemnie skorelowany z występowaniem depresji, podczas gdy genotyp A/A i allel A tego SNP były związane ze wzrostem częstości rozwoju depresji. Ponadto, genotyp G/G oraz allel G polimorfizmu c.-844G>T (rs4570625) genu *TPH2* były pozytywnie skorelowane z wystąpieniem depresji, podczas gdy heterozygota G/T i allel T tego SNP wykazywały odwrotną korelację. Genotyp C/C oraz allel C polimorfizmu c.-1449C>A (rs7963803) genu *TPH2* zmniejszał częstość wystąpienia depresji, natomiast heterozygota C/A i allel A tego polimorfizmu wykazywała odwrotną zależność [94]. W przypadku polimorfizmu c.\*456G>A (rs10988134) genu *KATI* genotyp A/A zwiększał częstość wystąpienia depresji. W przypadku pozostałych badanych polimorfizmów c.975-7T>C genu *KATII* (rs1480544), c.-1849C>A (rs3824259) i c.-1493G >C (rs10089084) genu *IDO1* nie wykazano ich wpływu na częstość wystąpienia depresji [95]. Co ciekawe, analiza wieku pierwszego epizodu depresji wykazała, że heterozygoty polimorfizmu c.-844G>T (rs4570625) zlokalizowanego w genie *TPH2* (rs4570625) doświadczały pierwszego epizodu depresji w młodszym wieku niż homozygoty G/G (Ryc. 13A) [94]. Ponadto, Andre i wsp. (2013) wykazali, że genotyp C/C polimorfizmu A218C genu *TPH1* może wiązać się z ciężkim przebiegiem depresji i zmniejszoną szansą uzyskania remisji w odpowiedzi na zastosowane leczenie [96]. Z kolei analiza wpływu płci na częstość wystąpienia depresji wykazała, że genotyp A/A polimorfizmu c. \*456G>A (rs10988134) genu *KATI* był pozytywnie skorelowany z rozwojem depresji, podczas gdy genotyp G/G był związany ze zmniejszeniem częstości przypadków depresji w populacji mężczyzn. Natomiast w populacji kobiet nie zaobserwowano wpływu tego polimorfizmu na częstość rozwoju depresji. Przeprowadzone badania wykazały wpływ wystąpienia

**Tabela 2.** Rozkład genotypów i alleli polimorfizmów c.804-7C>A, c.-1668T>A, c.803+221C>A, c.-173A>T, c.-1449C>A and c.-844G>T, c.\*456G>A i częstość występowania depresji.

Genotyp/ allel	Grupa kontrolna (n = 229)		Pacjenci z depresją (n = 281)		Crude OR (95% CI) <sup>a</sup>	p	Skorygowane OR (95% CI) <sup>a</sup>	p
	Liczba pacjentów	Częstość występowania	Liczba pacjentów	Częstość występowania				
<b>c.804-7C&gt;A - TPH1 (rs1799913)</b>								
<b>C/C</b>	<b>65</b>	<b>0,283</b>	<b>100</b>	<b>0,357</b>	<b>1,473 (1,013-2,141)</b>	<b>0,042</b>	<b>1,413 (0,969-2,060)</b>	<b>0,073</b>
C/A	118	0,513	127	0,454	0,865 (0,613-1,222)	0,411	0,787 (0,555-1,117)	0,180
A/A	47	0,204	53	0,189	0,964 (0,623-1,492)	0,868	0,908 (0,586-1,408)	0,666
$\chi^2 = 2,131; p = 0,345$								
C	248	0,539	327	0,584	1,288 (1,012-1,639)	0,040	1,196 (0,935-1,531)	0,154
A	212	0,461	233	0,416	0,911 (0,715-1,160)	0,448	0,836 (0,653-1,070)	0,154
<b>c.803+221C&gt;A - TPH1 (rs1800532)</b>								
C/C	66	0,287	93	0,331	1,319 (0,905-1,922)	0,150	1,212 (0,831-1,769)	0,318
<b>C/A</b>	<b>151</b>	<b>0,657</b>	<b>158</b>	<b>0,564</b>	<b>0,772 (0,543-1,098)</b>	<b>0,149</b>	<b>0,676 (0,471-0,969)</b>	<b>0,033</b>
A/A	11	0,048	29	0,104	2,416 (1,180-4,947)	0,016	2,308 (1,126-4,730)	0,022
$\chi^2 = 0,249; p = 0,883$								
C	283	0,615	344	0,614	1,160 (0,872-1,544)	0,307	0,970 (0,719-1,309)	0,843
A	173	0,376	216	0,386	1,170 (0,871-1,571)	0,298	1,058 (0,784-1,429)	0,712
<b>c.-173A&gt;T - TPH1 (rs10488682)</b>								
<b>T/T</b>	<b>119</b>	<b>0,517</b>	<b>167</b>	<b>0,596</b>	<b>1,515 (1,070-2,145)</b>	<b>0,019</b>	<b>1,377 (0,968-1,958)</b>	<b>0,075</b>
A/T	99	0,430	98	0,35	0,772 (0,541-1,102)	0,154	0,713 (0,498-1,020)	0,064
A/A	12	0,052	15	0,054	1,080 (0,495-2,355)	0,846	1,032 (0,473-2,252)	0,937
$\chi^2 = 2,221; p = 0,329$								
T	337	0,733	432	0,771	1,444 (1,095-1,904)	0,009	1,242 (0,927-1,664)	0,147
A	123	0,267	128	0,229	0,860 (0,644-1,149)	0,309	0,805 (0,601-1,079)	0,147
<b>c.-1668T&gt;A - TPH1 (rs623580)</b>								
<b>T/T</b>	<b>121</b>	<b>0,267</b>	<b>116</b>	<b>0,414</b>	<b>0,701 (0,496-0,992)</b>	<b>0,045</b>	<b>0,638 (0,449-0,908)</b>	<b>0,012</b>
T/A	95	0,733	132	0,471	1,371 (0,967-1,943)	0,077	1,264 (0,888-1,798)	0,193
A/A	14	0,061	32	0,114	2,092 (1,089-4,021)	0,027	1,996 (1,037-3,839)	0,038
$\chi^2 = 8,468; p = 0,014$								
T	337	0,413	364	0,65	0,800 (0,617-1,039)	0,094	0,667 (0,505-0,881)	0,004
A	123	0,526	196	0,35	1,598 (1,212-2,107)	<0,001	1,500 (1,136-1,981)	0,004
<b>c.-844G&gt;T - TPH2 (rs4570625)</b>								
<b>G/G</b>	<b>48</b>	<b>0,209</b>	<b>167</b>	<b>0,596</b>	<b>5,942 (3,999-8,831)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>5,647 (3,790-8,413)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>G/T</b>	<b>179</b>	<b>0,778</b>	<b>111</b>	<b>0,396</b>	<b>0,223 (0,153-0,324)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,186 (0,125-0,275)</b>	<b>&lt;0,001</b>
T/T	3	0,013	2	0,007	0,571 (0,0946-3,444)	0,541	0,546 (0,0905-3,299)	0,510
$\chi^2 = 78,662; p < 0,001$								
G	275	0,598	445	0,794	5,496 (3,764-8,027)	<0,001	5,213 (3,632-7,695)	<0,001
T	185	0,402	115	0,205	0,230 (0,159-0,333)	<0,001	0,192 (0,130-0,283)	<0,001
<b>c.-1449C&gt;A - TPH2 (rs7963803)</b>								
<b>C/C</b>	<b>114</b>	<b>0,496</b>	<b>96</b>	<b>0,343</b>	<b>0,581 (0,408-0,828)</b>	<b>0,003</b>	<b>0,529 (0,370-0,759)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>C/A</b>	<b>106</b>	<b>0,461</b>	<b>178</b>	<b>0,636</b>	<b>2,223 (1,563-3,160)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,054 (1,438-2,934)</b>	<b>&lt;0,001</b>
A/A	10	0,043	6	0,021	0,506 (0,181-1,413)	0,193	0,478 (0,171-1,338)	0,160
$\chi^2 = 7,447; p = 0,024$								
C	334	0,726	370	0,661	0,823 (0,609-1,111)	0,203	0,641 (0,463-0,886)	0,007
A	126	0,274	190	0,339	1,694 (1,228-2,335)	0,001	1,561 (1,128-2,159)	0,007
<b>c.*456G&gt;A - KAT1 (rs10988134)</b>								
<b>A/A</b>	<b>9</b>	<b>0,038</b>	<b>23</b>	<b>0,082</b>	<b>2,266 (1,027-4,998)</b>	<b>0,043</b>	<b>2,269 (1,029-5,007)</b>	<b>0,042</b>
A/G	77	0,326	95	0,338	1,066 (0,738-1,540)	0,733	1,065 (0,737-1,539)	0,736
G/G	150	0,636	163	0,580	0,782 (0,548-1,117)	0,176	0,783 (0,548-1,117)	0,177
$\chi^2 = 3,659; p = 0,056$								
A	95	0,201	141	0,251	1,323 (0,991-1,766)	0,058	1,323 (0,991-1,766)	0,058
G	377	0,799	421	0,749	0,756 (0,566-1,009)	0,058	0,756 (0,566-1,009)	0,058

$p < 0,05$  wraz z odpowiednimi ORs są pogrubione. <sup>a</sup>OR dostosowany do płci.

genotypu A/A SNP c.\*456G>A (rs10988134) genu *KATI* oraz genotypu T/T polimorfizmu c.975-7T>C (rs1480544) genu *KATII* na obniżenie skuteczności konwencjonalnej terapii SSRI (Ryc. 13B, 13C i Tab. 2) [95].

## PODSUMOWANIE

Szeroka analiza oparta o wyniki uzyskane w ramach badań *in vivo* i *in vitro* i wnioski ujęte w pracy przyczyniają się do pełniejszego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój depresji na poziomie molekularnym. Z uwagi na ciągły wzrost nowych zachorowań oraz wystąpienia kolejnych epizodów depresji u tych samych pacjentów, jak również problemy diagnostyczne i terapeutyczne, dane z przeprowadzonych badań mogą posłużyć do opracowania nowych, skuteczniejszych metod, ułatwiających trafną diagnostykę, a także mogą przyczynić się w przyszłości do opracowania spersonalizowanej terapii właściwej dla danej pacjenta.

Do najważniejszych wniosków przeprowadzonych badań należą:

- stres oksydacyjny i nitracyjny, a także zaburzenia w przebiegu szlaku katabolitów tryptofanu są zaangażowane w mechanizm rozwoju depresji na poziomie molekularnym;
- polimorficzne warianty genów zaangażowanych w stres oksydacyjny (*SOD2*, *GPx4*, *CAT*) i nitrowanie (*NOS1*, *NOS2*) oraz szlak katabolitów tryptofanu (*TPH1*, *TPH2*, *IDO1*, *KATI*, *KATII*) wpływają na ryzyko wystąpienia depresji oraz
- depresja i terapia wenlafaksyną mogą modulować poziom ekspresji i stopień metylacji regionów promotorycznych genów zaangażowanych w stres oksydacyjny i nitrowanie (*SOD1*, *SOD2*, *GPx1*, *GPx4*, *NOS1*) oraz szlak katabolitów tryptofanu (*Ido1*, *Tph1*, *Tph2*, *KatI*, *KatII*), a zmiany te zależą od rodzaju tkanki, a także od badanych struktur mózgu.

## PIŚMIENNICTWO

1. Anderson P, McDavid D, Basu S, Stuckler D (2011) Impact of economic crises on mental health. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe.
2. Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, Gasquet I, Kovess V, Lepine JP, Angermeyer MC, Bernert S, de Girolamo G, Morosini P, Polidori G, Kikkawa T, Kawakami N, Ono Y, Takeshima T, Uda H, Karam EG, Fayyad JA, Karam AN, Mneimneh ZN., Medina-Mora ME, Borges G, Lara C, de Graaf R, Ormel J, Gureje O, Shen Y, Huang Y, Zhang M, Alonso J, Haro JM, Vilagut G, Bromet EJ, Gluzman S, Webb C, Kessler RC, Merikangas KR, Anthony JC, Von Korff MR, Wang PS, Brugha TS, Aguilar-Gaxiola S, Lee S, Heeringa S, Pennell BE, Zaslavsky AM, Ustun TB, Chatterji S (2004) WHO World Mental Health Survey Consortium Prevalence, Severity, and Unmet Need for Treatment of Mental Disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA* 291(21): 2581-2590
3. Kessler RC (2003) Epidemiology of women and depression. *J Aff Dis* 74: 5-13
4. Wang PS, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Angermeyer MC, Borges G, Bromet EJ, Bruffaerts R, de Girolamo G, de Graaf R, Gureje O, Haro JM, Karam EG, Kessler RC, Kovess V, Lane MC, Lee S, Levinson D, Ono Y, Petukhova M, Posada-Villa J, Seedat S, Wells JE (2007) Use of mental health services for anxiety, mood, and substance disorders

in 17 countries in the WHO world mental health surveys. *Lancet* 370(9590): 841-50

5. Vilagut G, Forero CG, Barbaglia G, Alonso J (2016) Screening for depression in the general population with the Center for Epidemiologic Studies Depression (CES-D): a systematic review with meta-analysis. *PLoS One* 11(5): e0155431
6. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. (2018) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392(10159):1789-1858
7. Reddy MS (2012) Depression - the global crisis. *Indian J Psychol Med* 34(3): 201-203
8. Al-Harbi KS (2012) Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence* 6: 369-388
9. Iwata M, Ota KT, Duman RS (2013) The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun* 31: 105-114
10. Wciórka J, Pużyński S, Rybakowski J (2010) *Psychiatria, W: Wciórka J, Pużyński S, Rybakowski J (red.) Metody leczenia, Zagadnienia etyczne, prawne, publiczne, społeczne, t. III. Elsevier Urban & Partner, str. 65-123, 199-204*
11. Marcus MM, Yasamy T, Ommeren M, Chisholm D, Saxena S (2012) Depression: A Global Public Health Concern. [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/who\\_paper\\_depression\\_wfmh\\_2012.pdf](http://www.who.int/mental_health/management/depression/who_paper_depression_wfmh_2012.pdf)
12. Clarke DM, Currie KC (2009) Depression, anxiety and their relationship with chronic diseases: a review of the epidemiology, risk and treatment evidence. *Med J Aust* 190(S7): 54-60
13. Dutta A, Barker K, Kallarakal A (2015) The HIV Treatment Gap: Estimates of the Financial Resources Needed versus Available for Scale-Up of Antiretroviral Therapy in 97 Countries from 2015 to 2020. *PLoS Med* 12(11): e1001907
14. Greenberg PE, Fournier AA, Sisitsky T, Pike CT, Kessler RC (2015) The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States (2005 and 2010). *J Clin Psychiatry* 76(2): 155-162
15. Voigt J, Sasha JM, Taylor A, Krucoff M, Reynolds MR, Gibson CM (2014) A reevaluation of the costs of heart failure and its implications for allocation of health resources in the United States. *Clin Cardiol* 37(5): 312-321
16. Osińska M, Kazberuk A, Celińska-Janowicz K, Zadykowicz R, Rysiak E (2017) Depression - civilization disease of the 21st century. *Geriatrics* 11: 123-129
17. Lopizzo N, Bocchio Chiavetto L, Cattaneo N, Plazzotta G, Tarazi FI, Pariante CM, Riva MA, Cattaneo A (2015) Gene-environment interaction in major depression: focus on experience-dependent biological systems. *Front Psychiatry* 6: 68
18. Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, Yang W, Cui R (2017) The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast* 2017: 6871089
19. Rajkowska G (2003) Depression: what we can learn from postmortem studies. *Neuroscientist* 9(4): 273-284
20. Di Chiara G, Loddo P, Tanda G (1999) Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biol Psychiatry* 46(12): 1624-1633
21. Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwab JM, Kennedy SH (2005) Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression. *Neuron* 45(5): 651-660
22. Mayberg HS, Brannan SK, Tekell JL, Silva JA, Mahurin RK, McGinnis S, Jerabek PA (2000) Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry* 48(8): 830-843
23. Matthews PR, Harrison PJ (2012) A morphometric, immunohistochemical, and in situ hybridization study of the dorsal raphe nucleus in major depression, bipolar disorder, schizophrenia, and suicide. *J Affect Disord* 137(1-3): 125-134

24. Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen JJ, Mann JJ (2001). Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 25(6): 892-903
25. Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31(9): 464-468
26. Scheggi S, Leggio B, Masi F, Grappi S, Gambarana C, Nanni G, Rauggi R, De Montis MG (2002) Selective modifications in the nucleus accumbens of dopamine synaptic transmission in rats exposed to chronic stress. *J Neurochem* 83(4): 895-903
27. Zablocka A, Janusz M (2008) The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw* 62: 118-124
28. Lindqvist D, Dhabhar FS, James SJ, Hough CM, Jain FA, Bersani FS, Reus VI, Verhoeven JE, Epel ES, Mahan L, Rosser R, Wolkowitz OM, Mellon SH (2017) Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. *Psychoneuroendocrinology* 76: 197-205
29. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M (2011) Review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(3): 676-692
30. Bitanirhwre BK, Woo TU (2011) Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev* 35(3): 878-893
31. Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24(10): R453-R462
32. Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2): 312-322
33. Belleau EL, Treadway MT, Pizzagalli DA (2019) The impact of stress and major depressive disorder on hippocampal and medial prefrontal cortex morphology. *Biol Psychiatry* 85(6): 443-453
34. Kurutas EB (2016) The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J* 15(1): 71.
35. Salim S (2017) Oxidative stress and the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 360(1): 201-205.
36. Joshi YB, Pratico D (2014) Lipid peroxidation in psychiatric illness: overview of clinical evidence. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 828702
37. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* (1): 65-74
38. Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53: S26-S36
39. Papp M (2012) Models of affective illness: Chronic mild stress in the rat. *Curr Protoc Pharmacol* doi: 10.1002/0471141755.ph0509s57
40. Wigner P, Synowiec E, Czarny P, Bijak M, Jóźwiak P, Szmraj J, Gruca P, Papp M, Śliwiński T (2020) Effects of venlafaxine on the expression level and methylation status of genes involved in oxidative stress in rats exposed to a chronic mild stress. *J Cell Mol Med* 24(10): 5675-5694
41. Mokoena ML, Harvey BH, Viljoen F, Ellis SM, Brink CB (2015) Ozone exposure of Flinders Sensitive Line rats is a rodent translational model of neurobiological oxidative stress with relevance for depression and antidepressant response. *Psychopharmacology* 232(16): n2921-2938
42. Maciel AL, Abelaira HM, de Moura AB, de Souza TG, Rosa T, Matos D, Tuon T, Garbossa L, Strassi AP, Fileti ME, Goldim MP, Mathias K, Petronilho F, Quevedo J, Réus GZ (2018) Acute treatment with ketamine and chronic treatment with minocycline exert antidepressant-like effects and antioxidant properties in rats subjected different stressful events. *Brain Res Bull* 137: 204-216
43. Rai A, Gill M, Kinra M, Shetty R, Krishnadas N, Rao CM, Sumalatha S, Kumar N (2019). Catechin ameliorates depressive symptoms in Sprague Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress by decreasing oxidative stress. *Biomed Rep* 11(2): 79-84
44. Berk A, Yilmaz İ, Abacıoğlu N, Kaymaz MB, Karaaslan MG, Kuyumcu Savan E (2020). Antidepressant effect of *Gentiana olivieri* Griseb. in male rats exposed to chronic mild stress. *Libyan J Med* 15(1): 1725991
45. Wang D, An SC, Zhang X (2008) Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett* 43(1): 59-64
46. Moore LD, Le T, Fan G (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38(1): 23-38
47. Chen X, Guo C, Kong J (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 7(5): 376-385.
48. Irie M, Asami S, Ikeda M, Kasai H (2003) Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 1014-1018
49. Kupper N, Gidron Y, Winter J, Denollet J (2009) Association between type D personality, depression, and oxidative stress in patients with chronic heart failure. *Psychosom Med* 71(9): 973-980
50. Forlenza MJ, Miller GE (2006). Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom Med* 68(1): 1-7
51. Dimopoulos N, Piperi C, Psarra V, Lea RW, Kalofoutis A (2008) Increased plasma levels of 8-iso-PGF<sub>2</sub>α and IL-6 in an elderly population with depression. *Psychiatry Res* 161(1): 59-66
52. Galecki P, Szmraj J, Bienkiewicz M, Florkowski A, Galecka E (2009). Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during depressive episodes
53. and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacol Rep* 61(3): 436-447
54. Chung CP, Schmidt D, Stein CM, Morrow JD, Salomon RM (2013) Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. *Psychiatry Res* 206(2-3): 213-216
55. Herken H, Gurel A, Selekc S, Armutcu F, Ozen ME, Bulut M, Kap O, Yumru M, Savas HA, Akyol O (2007) Adenosine Deaminase, Nitric Oxide, Superoxide Dismutase, and Xanthine Oxidase in Patients with Major Depression: Impact of Antidepressant Treatment. *Arch Med Res* 38(2): 247-252
56. Michel TM, Camara S, Tatschner T, Frangou S, Sheldrick AJ, Riederer P, Grünblatt E (2010) Increased xanthine oxidase in the thalamus and putamen in depression. *World J Biol Psychiatry* 11(2-2): 314-320
57. Morris G, Berk M, Klein H, Walder K, Galecki P, Maes M (2017) Nitrosative Stress, Hypernitrosylation, and Autoimmune Responses to Nitrosylated Proteins: New Pathways in Neuroprogressive Disorders Including Depression and Chronic Fatigue Syndrome. *Mol Neurobiol* 54(6): 4271-4291
58. Pandya CD, Howell KR, Pillai A (2013) Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46: 214-223
59. Galecki P, Szmraj J, Bienkiewicz M, Zboralski K, Galecka E (2009) Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. *Hum Psychopharmacol* 24(4): 277-286
60. Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O (2001). Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64(1): 43-51
61. Vavakova M, Ďuračková Z, Trebatická J (2015) Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder. *Oxidat Med Cell Longev* 2015: 898393
62. Szuster-Ciesielska A, Słowińska M, Stachura A, Marmurowska-Michałowska H, Dubas-Slomp H, Bojarska-Junak A, Kandefer-Szerszeń M (2008) Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(3): 686-694
63. Camkurt MA, Fındıklı E, Bakacak M, Tolun Fİ, Karaaslan MF (2017) Evaluation of malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase activity in fetal cord blood of depressed mothers. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 15(1): 35-39

65. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N (2019) Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxidat Med Cell Longev* 2019: 9613090
66. Wigner P, Czarny P, Synowiec E, Bijak M, Bialek K, Talarowska M, Galecki P, Szemraj J, Sliwinski T (2018) Variation of genes involved in oxidative and nitrosative stresses in depression. *Eur Psychiatry* 48: 38-48
67. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 30(1): 11-26
68. Kim YK, Paik JW, Lee SW, Yoon D, Han C, Lee BH (2006) Increased plasma nitric oxide level associated with suicide attempt in depressive patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(6): 1091-1096
69. Savaş HA., Herken H, Yürekli M, Uz E, Tutkun H, Zoroğlu SS, Ozen ME, Cengiz B, Akyol O (2002) Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder. *Neuropsychobiology* 45(2): 57-61
70. Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E, Yumru M (2008) The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J Affect Disord* 107(1-3): 89-94
71. Maes M, Kubera M, Mihaylova I, Geffard M, Galecki P, Leunis JC, Berk M (2013) Increased autoimmunity responses against auto-epitopes modified by oxidative and nitrosative damage in depression: implications for the pathways to chronic depression and neuroprogression. *J Affect Disord* 149(1-3): 23-29
72. Büki A, Kekesi G, Horvath G, Vécsei L (2021) A Potential Interface between the Kynurenine Pathway and Autonomic Imbalance in Schizophrenia. *Int J Mol Sci* 22(18): 10016
73. Tanke MA, Alserda E, Doornbos B, van der Most PJ, Goeman K, Postema F, Korf J (2008) Low tryptophan diet increases stress-sensitivity, but does not affect habituation in rats. *Neurochem Int* 52(1-2): 272-281
74. Jacobsen JP, Siesser WB, Sachs BD, Peterson S, Cools MJ, Setola V, Folgering JH, Flik G, Caron MG (2012) Deficient serotonin neurotransmission and depression-like serotonin biomarker alterations in tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) loss-of-function mice. *Mol Psychiatry* 17(7): 694-704
75. Wigner P, Czarny P, Galecki P, Su KP, Sliwinski T (2018) The molecular aspects of oxidative & nitrosative stress and the tryptophan catabolites pathway (TRYCATs) as potential causes of depression. *Psychiatry Res* 262: 566-574
76. Chen Y, Xu H, Zhu M, Liu K, Lin B, Luo R, Chen C, Li M (2017) Stress inhibits tryptophan hydroxylase expression in a rat model of depression. *Oncotarget* 8(38): 63247-63257
77. Jiao H, Yan Z, Ma Q, Li X, Jiang Y, Liu Y, Chen J (2019) Influence of Xiaoyaosan on depressive-like behaviors in chronic stress-depressed rats through regulating tryptophan metabolism in hippocampus. *Neuropsychiatr Dis Treat* 15: 21-31
78. Wigner P, Synowiec E, Jóźwiak P, Czarny P, Bijak M, Bialek K, Szemraj J, Gruca P, Papp M, Śliwiński T (2020) The effect of chronic mild stress and venlafaxine on the expression and methylation levels of genes involved in the tryptophan catabolites pathway in the blood and brain structures of rats. *J Mol Neurosci* 70(9): 1425-1436
79. Stone TW (2001) Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicol* 39(1): 61-73
80. Savitz J, Drevets WC, Smith CM, Victor TA, Wurfel BE, Bellgowan PS, Bodurka J, Teague TK, Dantzer R (2015) Putative neuroprotective and neurotoxic kynurenine pathway metabolites are associated with hippocampal and amygdalar volumes in subjects with major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 40(2): 463-471
81. Myint AM, Kim YK, Verkerk R, Scharpé S, Steinbusch H, Leonard B (2007) Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. *J Affect Disord* 98(1-2): 143-151
82. Wichers MC, Koek GH, Robaey G, Verkerk R, Scharpé S, Maes M (2005) IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Mol Psychiatry* 10(6): 538-544
83. Ara I, Bano S (2012) Citalopram decreases tryptophan 2,3-dioxygenase activity and brain 5-HT turnover in swim stressed rats. *Pharmacol Rep* 64(3): 558-566
84. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Briley EM, Szegedi SS, Lestage J et al (2009) Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior. *J Immunol* 182(5): 3202-3212
85. Lawson MA, Parrott JM, McCusker RH, Dantzer R, Kelley KW, O'Connor JC (2013) Intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide induces indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent depression-like behaviors. *J Neuroinflamm* 10(87): 1-9
86. Liu YN, Peng YL, Liu L, Wu TY, Zhang Y, Lian YJ, Yang YY, Kelley KW, Jiang CL, Wang YX (2015) TNF $\alpha$  mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *Eur Cytokine Netw* 26: 15-25
87. Salazar, Gonzalez-Rivera BL, Redus, Parrott JM, O'Connor JC (2012) Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. *Horm Behav* 62: 202-209
88. Olney JW, Farber NB (1995) Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52: 998-1007
89. Majláth Z, Török N, Toldi J, Vécsei L (2016). Memantine and Kynurenic Acid: Current Neuropharmacological Aspects. *Curr Neuropharmacol* 14(2): 200-209.
90. Linderholm KR, Andersson A, Olsson S, Olsson E, Snodgrass R, Engberg G, Erhardt S (2007) Activation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by endogenous kynurenic acid: a pharmacological analysis. *Neuropharmacology* 53: 918-924
91. Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, Barone PR (2010) Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. *Behav Brain Res* 210(1): 84-91
92. Maes M, Leonard BE, Myint AM, Kubera M, Verkerk R (2011a) The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(3): 702-721
93. Maes M, Galecki P, Verkerk R, Rief W (2011b) Somatization, but not depression, is characterized by disorders in the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, indicating increased indoleamine 2,3-dioxygenase and lowered kynurenine aminotransferase activity. *Neuro Endocrinol Lett* 32(3): 264-273
94. Chen Y, Xu H, Zhu M, Liu K, Lin B, Luo R, Chen C, Li M (2017) Stress inhibits tryptophan hydroxylase expression in a rat model of depression. *Oncotarget* 8(38): 63247-63257
95. Kodydková J, Vávrová L, Zeman M, Jiráček R, Macásek J, Stanková B, Tvrzická E, Zák A (2009) Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem* 42(13-14): 1368-1374
96. Wigner P, Czarny P, Synowiec E, Bijak M, Bialek K, Talarowska M, Galecki P, Szemraj J, Sliwinski T (2018) Association between single nucleotide polymorphisms of TPH1 and TPH2 genes, and depressive disorders. *J Cell Mol Med* 22(3): 1778-1791
97. Wigner P, Czarny P, Synowiec E, Bijak M, Talarowska M, Galecki P, Szemraj J, Sliwinski T (2018) Variation of genes encoding KAT1, AADAT and IDO1 as a potential risk of depression development. *Eur Psychiatry* 52: 95-103
98. Andre K, Kampman O, Viikki M, Illi A, Setälä-Soikkeli E, Poutanen O, Mononen N, Leinonen E, Lehtimäki T (2013). TPH1 A218C polymorphism and temperament in major depression. *BMC Psychiatry* 13: 118

# The role of oxidative and nitrosative stress and the tryptophan catabolites pathway in the pathogenesis of depression

Paulina Wigner✉, Tomasz Śliwiński

Laboratory of Medical Genetics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz

✉corresponding author: paulina.wigner@biol.uni.lodz.pl

**Keywords:** depression, chronic mild stress, oxidative stress, nitritive stress, tryptophan catabolite pathway

## ABSTRACT

Depression is the most common mental illness, affecting approximately 350 million people around the world. Despite numerous studies, the etiology of this disease remains unclear. Previous studies suggest the involvement of interrelated biochemical pathways, i.e. oxidative and nitritive stress as well as abnormalities of the tryptophan catabolites pathway (TRYCATs) in the depression development. Therefore, the aim of this study was to explain the role of oxidative and nitritive stress as well as disorders in the course of the TRYCATs pathway in the molecular basis of depression. In this study, an attempt was made to determine the effect of single nucleotide polymorphisms, located in genes, encoding enzymes involved in oxidative and nitritive stress, and the TRYCATs pathway on the incidence of depression. Moreover, using an *in vivo* model of depression, the impact of chronic mild stress stimuli on mRNA expression and protein amount as well as the degree of methylation of the promoter regions of genes encoding enzymes involved in the studied pathways was assessed. The obtained results clearly confirmed the studied biochemical pathways are involved in the development of depression at the molecular level.

