

Krzysztof Pietruczuk

**WPŁYW LEKÓW NORMOTYMICZNYCH NA APOPTOZĘ
ORAZ AKTYWACJĘ LIMFOCYTÓW T KRWI OBWODOWEJ U
PACJENTÓW Z CHOROBAŁĄ AFEKTYWNAŁĄ DWUBIEGUNOWAŁĄ.**

Rozprawa doktorska

Katedra i Zakład Fizjopatologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

PROMOTOR:
prof. dr hab. n. med. Jacek Maciej Witkowski

„Niekiedy wątpię,
By ciche i spokojne życie zadowalało mnie,
Pomimo to czasami bardzo go pragnę.”

Byron

„... znalazłam się w cyklach choroby maniakalno-depresyjnej, akurat gdy rozpoczynałam życie zawodowe. To spowodowało, że z konieczności i intelektualnej ciekawości zaczęłam się zajmować nastrojami. **Był to jedyny sposób, by zrozumieć, a w rzeczywistości zaakceptować chorobę, która mnie dotknęła**”.

„NIESPOKOJNY UMYŚŁ”

- Kay Redfield Jamison

Dziękuję Rodzicom za wsparcie i cierpliwość.
Za to, że cały czas są przy mnie.
Bez nich powstanie tej pracy byłoby niemożliwe.

Dziękuję mojemu Promotorowi
Profesorowi dr hab. n. med. Jackowi Witkowskiemu
za przekazaną wiedzę, poświęcony czas,
cenne uwagi i okazaną pomoc.

Pragnę serdecznie podziękować całemu zespołowi
Katedry i Zakładu Fizjopatologii oraz
Zakładowi Patologii i Reumatologii Doświadczalnej
za pomoc i życzliwość każdego dnia.
Szczególne podziękowania dr n. med. Katarzynie Lisowskiej
oraz dr med. Katarzynie Rückemann-Dziurdzińskiej
za pomoc przy redagowaniu pracy.

Swoje podziękowania pragnę również złożyć wszystkim
pracownikom Kliniki Chorób Psychiczych i Zaburzeń Nerwicowych,
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
szczególnie dr med. Karolowi Grabowskiemu.

SPIS TREŚCI

Wykaz ważniejszych skrótów użytych w tekście	7
1. Wstęp.....	8
1.1 Choroba afektywna dwubiegunowa – pojęcia podstawowe	8
1.2 Leki normotymiczne w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej.....	12
1.2.1 Sole litu – mechanizmy działania	12
1.2.2 Kwas walproinowy – mechanizmy działania	16
1.3 Powiązanie pomiędzy układem nerwowym, endokrynnym a immunologicznym.....	17
1.3.1 Unerwienie tkanek limfoidalnych.....	18
1.3.2 Wpływ hormonów na komórki układu immunologicznego.....	20
1.3.3 Rola cytokin i ich wpływ na komórki układu nerwowego.....	20
1.4 Zaburzenia immunologiczne w chorobie afektywnej dwubiegunowej.....	22
1.5 Znaczenie procesu apoptozy w chorobie afektywnej dwubiegunowej.....	24
1.5.1 Apoptoza – pojęcia podstawowe.....	24
1.5.2 Apoptoza neuronów w przebiegu niektórych schorzeń neuropsychiatrycznych	26
1.5.3 Apoptoza limfocytów w przebiegu chorób psychicznych.....	28
2. Założenia i cele pracy	30
3. Materiał i metody	31
3.1 Osoby badane	31
3.2 Ocena aktualnego stanu psychicznego.....	32
3.2.1 Skala Depresji Becka.....	32
3.2.2 Skala Depresji Hamiltona.....	33
3.2.3 Skala Manii Według Younga.....	33
3.3 Ocena fenotypu, proliferacji oraz podatności na apoptozę limfocytów T osób zdrowych i chorych na CHAD metodą cytometrii przepływowej.....	33
3.3.1 Cytometria przepływowa.....	33
3.3.2 Materiał badany.....	34

3.3.3	Ocena fenotypu limfocytów krwi obwodowej ex vivo.....	34
3.3.4	Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej.....	34
3.3.5	Ocena dynamiki proliferacji limfocytów osób zdrowych i chorych w obecności badanych leków – węglanu litu oraz kwasu walproinowego.....	35
3.3.6	Indukcja apoptozy i jej modulacja przy pomocy badanych leków w hodowlach PBMC osób zdrowych oraz pacjentów.....	37
3.3.7	Metody oceny apoptozy.....	38
3.3.8	Ocena poziomu cytokin w surowicy krwi.....	40
3.4	Indukcja apoptozy i jej modulacja przy pomocy badanych leków w linii komórkowej MOLT-4.....	40
3.5	Analiza wyników cytometrycznych.....	41
3.6	Analiza statystyczna.....	41
4.	Wyniki badań	42
4.1	Ocena stanu psychicznego z wykorzystaniem Skali Depresji Becka, Skali Depresji Hamiltona oraz Skali Manii Younga.....	42
4.2	Ocena fenotypu limfocytów krwi obwodowej ex vivo.....	44
4.3	Ocena poziomu cytokin w surowicy krwi.....	51
4.4	Ocena wpływu leków normotymicznych na proliferację limfocytów T.....	56
4.4.1	Porównanie parametrów proliferacji limfocytów T pomiędzy osobami zdrowymi i chorymi na CHAD.....	58
4.4.2	Ocena wpływu leków normotymicznych na proliferację limfocytów CD4+ in vitro.....	65
4.4.3	Ocena wpływu leków normotymicznych na proliferację limfocytów CD8+ in vitro.....	70
4.5	Ocena wpływu leków normotymicznych na apoptozę PBMC.....	76
4.5.1	Ocena wpływu leków normotymicznych na apoptozę PBMC osób zdrowych In vitro.....	76
4.5.2	Porównanie wpływu leków normotymicznych na apoptozę PBMC osób zdrowych i chorych in vitro.....	84

4.6 Ocena wpływu leków normotymicznych na apoptozę komórek linii MOLT-4.....	92
5. Dyskusja.....	99
6. Wnioski.....	109
7. Literatura.....	110
8. Streszczenie.....	118
9. Abstrakt.....	119
10. Załączniki.....	120
Załącznik nr 1 – Deklaracja świadomej zgody.....	121
Załącznik nr 2 – Informacja dla pacjentów.....	122
Załącznik nr 3 – Formularz dla pacjenta.....	123
Załącznik nr 4 – Skala Depresji Becka. Skala Depresji Hamiltona.....	124
Załącznik nr 5 – Skala Manii Younga.....	133
Załącznik nr 6 – Formularz dla lekarza.....	136

Wykaz ważniejszych skrótów użytych w tekście:

CHAD	-	choroba afektywna dwubiegunowa
ConA	-	konkanawalina A
DCT	-	ang. dividing cell tracking
DMSO	-	dimetylosulfotlenek
DSM-IV	-	ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, zbiór kryteriów diagnostycznych
$\Delta\Psi$	-	potencjał transbłonowy błony mitochondrialnej
FCS	-	inaktywowana surowica cielęca
FSC	-	ang. Forward Scatter Chanel, detektor rozproszenia światła zgodny z kierunkiem wiązki laserowej
JC-1	-	5,5',6,6'- tetra chloro – 1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolycarbocyaninie iodide
MOLT-4	-	linia komórkowa – linia białaczkowa limfocytów T
PBMC	-	ang. peripheral blood mononuclear cells, jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PBS	-	buforowana fosforanami sól fizjologiczna
PE	-	fikoerytryna
PE-Cy5	-	fikoerytryna-cyjanina 5
PE-Cy7	-	fikoerytryna-cyjanina 7
PI	-	jodek propidyny (propidium iodide)
SCID	-	ang. Structural Clinical Interview for DMS-IV Disorders
SSC	-	ang. Side Scatter Chanel, detector mierzący ilość światła rozproszonego pod $\approx 90^\circ$ od osi optycznej
VPA	-	kwas walproinowy
YMRS	-	ang. Young Mania Rating Scale, skala manii Younga

1. WSTĘP

1.1. Choroba afektywna dwubiegunowa – pojęcia podstawowe.

Choroba afektywna dwubiegunowa (CHAD) to przewlekłe zaburzenie psychiczne, w którym pacjent doświadcza zarówno stanów depresyjnych jak i maniakalnych/hipomaniakalnych albo tak zwanych stanów mieszanych [1, 2]. Cierpi na nią około 1-5% osób ogólnej populacji [3]. Poważnym zagrożeniem związanym z CHAD jest występowanie u pacjentów prób samobójczych. Szacuje się, że około 30% chorych podczas ostrych epizodów choroby wykazuje zachowania samobójcze, a około 20% pacjentów umiera odbierając sobie życie [3]. Przeciętny wiek wystąpienia pierwszego epizodu choroby dwubiegunowej to mniej niż 30 lat. Zarówno kobiety jak i mężczyźni chorują tak samo często [4].

CHAD niesie ze sobą również poważne skutki ekonomiczno-społeczne, gdyż towarzyszy jej obniżona jakość życia, powstanie niepełnosprawności zawodowej, często wiąże się z utratą pracy i powoduje istotny wzrost kosztów opieki zdrowotnej [5, 6].

Rozróżniamy kilka podtypów zaburzeń afektywnych dwubiegunowych w zależności od przebiegu i nasilenia objawów choroby [2, 4]:

- **choroba afektywna dwubiegunowa typ I** – w obrazie choroby występują epizody maniakalne lub stany mieszane ze współwystępowaniem psychozy lub bez psychozy, i/lub duża depresja;
- **choroba afektywna dwubiegunowa typ II** – w tym typie epizody hipomaniakalne współwystępują z dużą depresją, bez manii lub stanów mieszanych w historii choroby;
- **cyklotymia** – to występowanie hipomanii i objawów depresyjnych, których nie można zaliczyć do typu II CHAD, nie występuje w tym przypadku epizod dużej depresji;
- **pozostałe zaburzenia dwubiegunowe** – stany nie spełniające kryteriów typu I i II oraz cyklotymii, przykładowy obraz przebiegu choroby: objawy maniakalne trwają mniej niż tydzień bez psychozy i bez potrzeby hospitalizacji.

Rozpoznanie choroby afektywnej dwubiegunowej i poszczególnych epizodów ustalane są według kryteriów diagnostycznych DSM-IV (ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*). Kryteria charakterystyczne dla CHAD według DSM-IV zostały zebrane w czterech tabelach. Tabela 1 stanowi zbiór charakterystycznych symptomów dla fazy maniakalnej w przebiegu CHAD, tabela 2 przedstawia kryteria rozpoznania dużego epizodu depresyjnego, tabela 3 – kryteria wystąpienia epizodu mieszanego. Natomiast tabela 4 prezentuje kryteria dla zachowań

hipomaniakalnych. Wzajemne zależności pomiędzy tymi objawami (epizodami) choroby pokazuje Rycina 1.

Choroba afektywna dwubiegunowa ma podłoże biologiczne. Jej występowanie u członka rodziny wiąże się z 4-5ciokrotnym wzrostem ryzyka wystąpienia u krewnego osoby chorej [7]. Obciążenie rodzinne tą chorobą wynika z defektu zespołów genów. Głównie są to geny które kodują neurotransmitery albo są w jakiś sposób związane z miejscami działania leków normotymicznych. W tym kontekście intensywnie badanymi genami są: gen dla hydroksylazy tyrozynowej (chromosom X) oraz geny podjednostek białka G.

Zmiany zachodzące w mózgach pacjentów z CHAD są obserwowane w badaniach neuroradiologicznych. W badaniach obrazowych wykazano zmiany aktywności układu limbicznego, a przy użyciu MRI obserwowano uszkodzenia neurodegeneracyjne głównie w rejonie trzeciej komory mózgu. U chorych z CHAD dochodzi również do zaburzeń wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału, w tym zaburzenia homeostazy wapnia – wykazano że w trombocytach i limfocytach u chorych jest wyższe stężenie wewnątrzkomórkowe jonów wapnia [8]. Zwraca się również uwagę, iż w przypadku zaburzeń dwubiegunowych bodźce zewnętrzne wywierają mniejszy wpływ na przebieg choroby niż w przypadku zaburzeń jednobiegunowych [8].

Tabela 1. Kryteria DSM-IV dla epizodu maniakalnego [4, 8, 9].

A	Wyodrębniający się okres nieprawidłowego i stale podwyższonego lub drażliwego nastroju, trwający przynajmniej 1 tydzień (lub niezależnie od czasu trwania jeżeli pacjent wymaga hospitalizacji).
B	W trakcie trwania epizodu zaburzeń nastroju utrzymują się co najmniej trzy spośród wymienionych niżej objawów (lub cztery gdy występuje tylko nastrój drażliwy) i są znacznie nasilone.
1	Podwyższona samoocena lub przekonanie o własnej wielkości.
2	Zmniejszona potrzeba snu.
3	Większa niż zwykle gadatliwość lub przymus mówienia.
4	Gonitwa myśli lub subiektywne jej uczucie.
5	Rozkojarzenie.
6	Wzrost aktywności ukierunkowanej na określony cel (społecznej, zawodowej, szkolnej, seksualnej) lub pobudzenie psychoruchowe.
7	Nadmierne zaangażowanie w czynności przynoszące przyjemność, które mogą powodować przykre następstwa.
C	Objawy nie spełniają kryteriów rozpoznania stanów mieszanych.
D	Zaburzenie nastroju jest tak poważne, że powoduje znaczne upośledzenie funkcjonowania zawodowego lub codziennej aktywności społecznej, relacji z innymi osobami bądź konieczna staje się hospitalizacja, która ma zapobiec wyrządzeniu przez niego szkody sobie lub innym osobom.
E	Objawy nie są spowodowane bezpośrednim wpływem substancji psychoaktywnych ani ogólnym stanem zdrowia (np. nadczynność tarczycy).

Tabela 2. Kryteria DSM-IV dla dużego epizodu depresyjnego [4, 7, 9] .

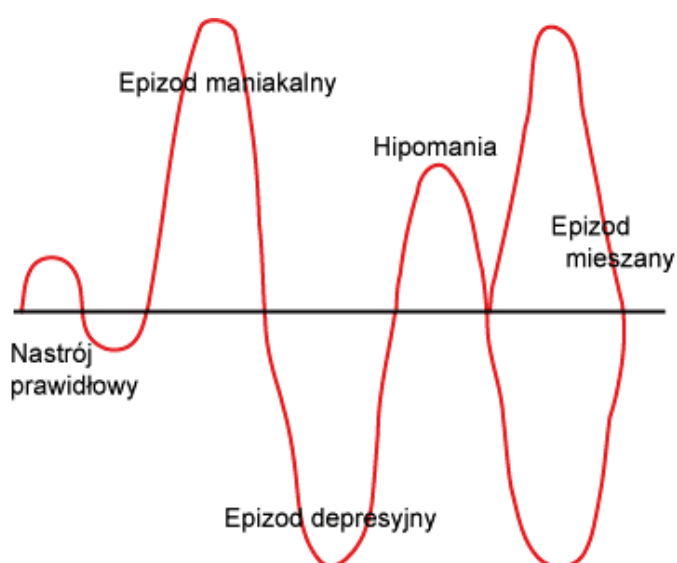
A	Obecność pięciu (lub więcej) spośród następujących objawów, utrzymujących się przez co najmniej 2 tygodnie i powodujących ograniczenie funkcjonowania - w tym albo obniżenie nastroju (1) albo utrata zainteresowań i odczuwania przyjemności (2).	
	1	Obniżenie nastroju przez większość dnia, niemal codziennie – u dzieci i nastolatków może występować nastrój drażliwy.
	2	Anhedonia – wyraźne zmniejszenie zainteresowań lub odczuwania przyjemności z wykonywania wszystkich lub niemal wszystkich czynności.
	3	Znacząca utrata lub przyrost masy ciała (np. wzrost lub spadek masy ciała o ponad 5% w ciągu miesiąca) lub obniżenie albo wzrost apetytu, występujące niemal każdego dnia.
	4	Bezsenna lub nadmierna senność.
	5	Pobudzenie lub spowolnienie psychomotoryczne (zauważalne dla innych osób).
	6	Męczliwość lub utrata energii.
	7	Poczucie bezwartościowości lub nieuzasadnione poczucie winy (może być urojeniowe).
	8	Zmniejszona zdolność do myślenia lub koncentracji; niezdecydowanie.
	9	Nawracające myśli o samobójstwie lub śmierci, włącznie z próbami samobójczymi.
B	Objawy nie spełniają kryteriów dla epizodu mieszanego.	
C	Objawy powodują znaczące upośledzenie funkcjonowania.	
D	Objawy nie są skutkiem nadużywania substancji psychoaktywnych, działania leków ani ogólnego stanu somatycznego.	
E	Objawów nie można przypisać żałobie po stracie bliskiej osoby.	

Tabela 3. Kryteria DSM-IV dla epizodu mieszanego [4, 8, 9].

A	Spełnione są kryteria epizodu maniakalnego i epizodu dużej depresji przynajmniej każdego dnia w okresie jednego tygodnia.
B	Zaburzenie nastroju jest tak poważne, że powoduje znaczne upośledzenie funkcjonowania zawodowego lub codziennej aktywności społecznej, relacji z innymi osobami bądź konieczna staje się hospitalizacja , która ma zapobiec wyrządzeniu przez niego szkody sobie lub innym osobom.
C	Objawy nie są spowodowane bezpośrednim wpływem substancji psychoaktywnych ani ogólnym stanem zdrowia (np. nadczynność tarczycy)

Tabela 4. Kryteria DSM-IV dla epizodu hipomaniakalnego [4, 8, 9].

A	Wyodrębniający się okres nieprawidłowego i stale podwyższonego lub drażliwego nastroju, trwający przynajmniej 4 dni.
B	W trakcie trwania epizodu zaburzeń nastroju utrzymują się co najmniej trzy spośród wymienionych niżej objawów (lub cztery gdy występuje tylko nastrój drażliwy) i są znacznie nasilone.
1	Podwyższona samoocena lub przekonanie o własnej wielkości.
2	Zmniejszona potrzeba snu.
3	Większa niż zwykle gadatliwość lub przymus mówienia.
4	Gonitwa myśli lub subiektywne jej uczucie.
5	Rozkojarzenie.
6	Wzrost aktywności ukierunkowanej na określony cel (społecznej, zawodowej, szkolnej, seksualnej) lub pobudzenie psychoruchowe.
7	Nadmierne zaangażowanie w czynności przynoszące przyjemność, które mogą powodować przykre następstwa.
C	Epizod charakteryzuje się wyraźną zmianą w funkcjonowaniu – nie typową dla osoby z okresu bezobjawowego
D	Zaburzenie nastroju i zmiana w funkcjonowaniu jest zauważalna dla innych.
E	Zaburzenie nastroju nie jest tak poważne, aby powodować zaburzenia w aktywności społecznej i funkcjonowaniu zawodowym lub stwarzać konieczność hospitalizacji, nie występują też cechy psychotyczne
F	Objawy nie są spowodowane bezpośrednim wpływem substancji psychoaktywnych ani ogólnym stanem zdrowia (np. nadczynność tarczycy).

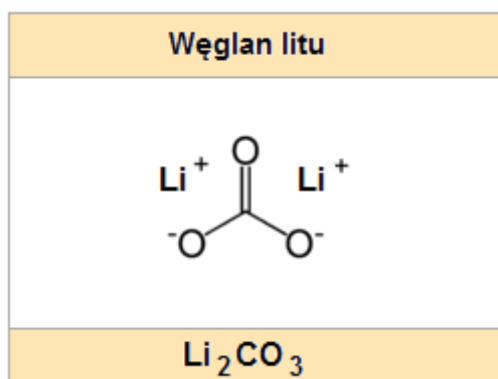
**Rycina 1.** Schemat zależności poszczególnych epizodów choroby afektywnej dwubiegunowej od nasilenia objawów w porównaniu do poziomu nastroju prawidłowego.

1.2. Leki normotymiczne w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej.

Leki normotymiczne to leki, które stabilizują nastrój, czyli zapobiegają zarówno objawom manii jak i depresji. Długotrwałe przyjmowanie tych leków pomaga zapobiegać zmianom nastroju i redukuje występowanie ostrych epizodów CHAD. Do najpowszechniej stosowanych leków normotymicznych należą: sole litu, kwas walproinowy, lamotrygina, karbamazepina oraz atypowe leki przeciwpsychotyczne – olanzapina, rispolept, kwetiapina [10]. W prezentowanej pracy omówione zostanie działanie soli litu oraz kwasu walproinowego.

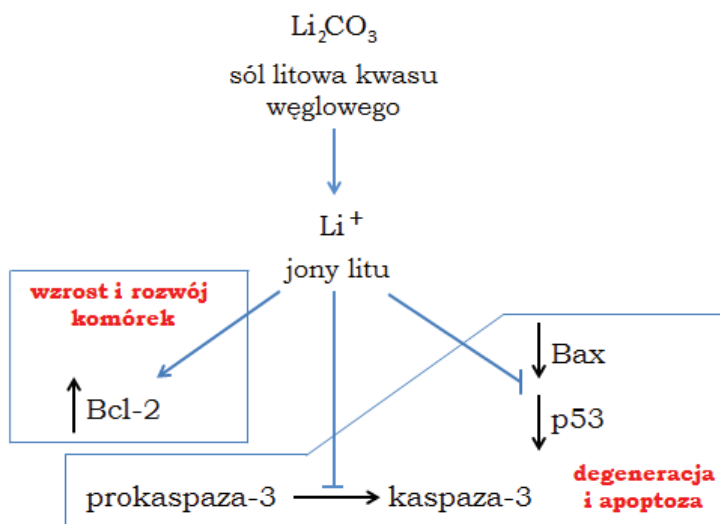
1.2.1. Sole litu – mechanizmy działania.

Węglan litu, którego wzór przedstawiony jest na rycinie 2, jest najczęściej używanym normotymikiem pierwszego rzutu. Stosuje się go z powodzeniem od około 50 lat przy leczeniu CHAD – zarówno jej fazy depresyjnej jak i maniakalnej [11]. Wydaje się, że węglan litu działa na wiele różnych procesów metabolicznych organizmu, ale mechanizmy jego działania nie są do końca dobrze poznane.



Rycina 2. Wzór strukturalny i sumaryczny węglanu litu.

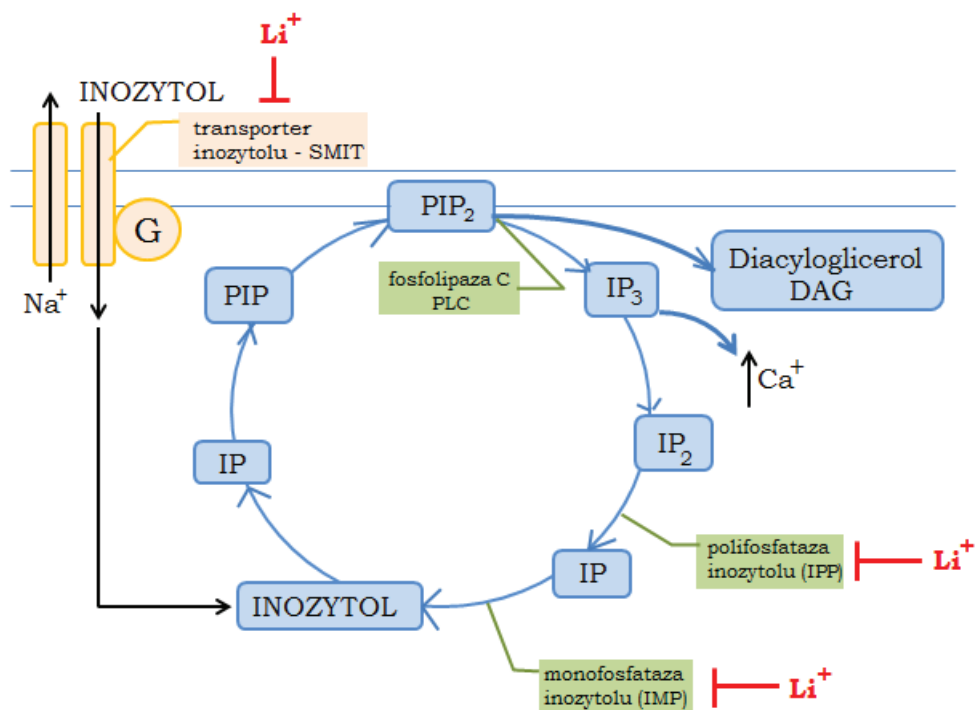
Jednym z celów działania jonów litu jest **regulacja procesu apoptozy oraz działanie cytoprotekcyjne** [12]. Trzema kluczowymi białkami w procesie apoptozy są: białko antyapoptotyczne Bcl-2, oraz białka proapoptotyczne Bax i p53 (ang. *tumor suppressor p53*). Efektem działania litu jest wzrost poziomu Bcl-2 w komórce przy jednoczesnym spadku stężenia białek proapoptotycznych (Ryc. 3). Ponadto, sole litu działają hamująco na proces aktywacji kaspazy-3 [13, 14].



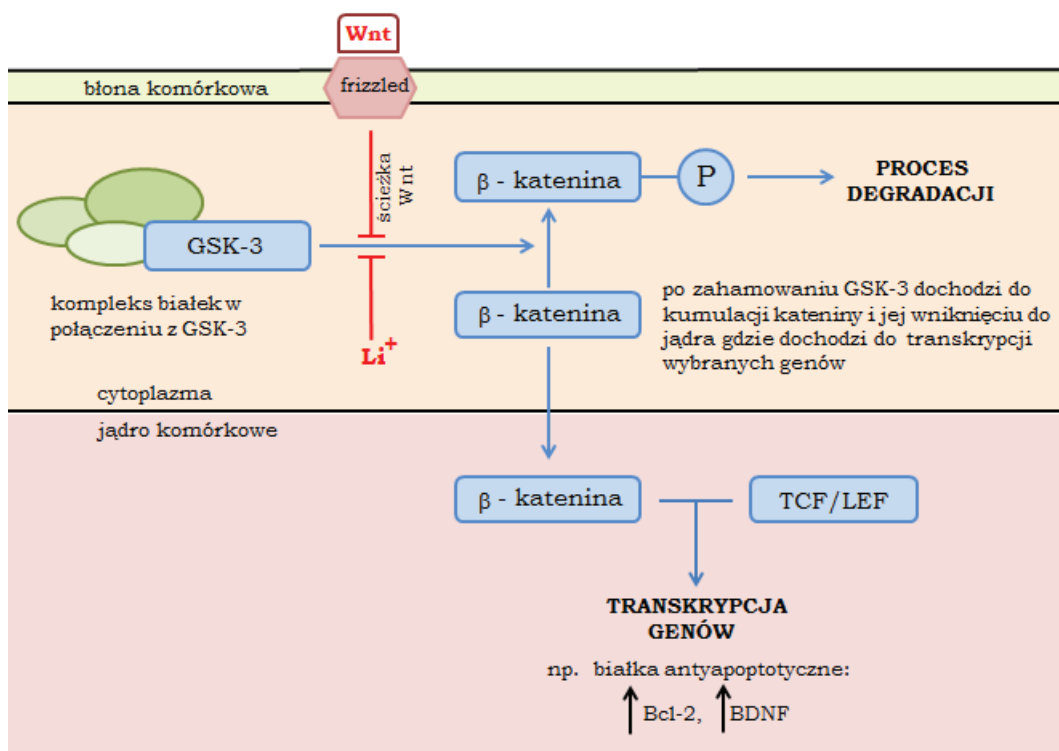
Rycina 3. Wpływ jonów litu na białka biorące udział w procesie degeneracji i apoptozy oraz białka Bcl-2 odpowiedzialnego za wzrost i rozwój komórek.

Lit bierze udział w różnych procesach regulacji sygnalizacji komórkowej. Wpływa na między innymi na **monofosfatazę inozytolu** – jony litu powodują hamowanie działania polifosfatazy inozytolu (ang. *inositol polyphosphatase*, IPP) oraz monofosfatazy inozytolu (ang. *inositol monophosphatase*, IMP) (Ryc. 4). Wynikiem tego jest gromadzenie się monofosforanu inozytolu (ang. *inositol monophosphate*, IP) i redukcja inozytolu oraz, co za tym idzie, wtórne obniżenie stężeń drugorzędowych przekaźników, jakimi są trifosfoinozytolu (ang. *inositol triphosphate*, IP₃) i diacyloglicerol (DAG). Wpływając na ten szlak sygnalizacji komórkowej sole litu pośrednio regulują ilość jonów wapnia Ca²⁺ w komórce. Jony litu blokują również przepływ do wnętrza komórki inozytolu poprzez transporter SMIT (ang. *sodium-myo-inositol co-transporter*), który jest sprzężony z białkami G, czego efektem jest spadek ilości inozytolu przechodzącego do wnętrza komórki [15, 16].

Ponadto jony litu wpływają też na ścieżkę sygnalizacji z udziałem kinazy 3 syntazy glikogenu (ang. *glycogen synthase kinase-3*, GSK-3) (Ryc. 5). GSK-3 w połączeniu z białkiem Axin fosforyluje β-kateninę, która jest degradowana, czego efektem jest zahamowanie ekspresji genów docelowych [17]. Sole litu, podobnie jak białko Wnt hamują działanie GSK-3, czego efektem jest akumulacja β-kateniny, która wówczas aktywuje transkrypcję genów docelowych, zależnych od czynników transkrypcyjnych z rodziny TCF (ang. *T-cell factor-1*) / LEF (ang. *lymphoid enhancer element*). W ten sposób ścieżka z udziałem GSK-3, jak i jony litu mogą kontrolować wiele ważnych procesów w komórce np. procesy embriogenezy, apoptozy i proliferacji różnych komórek jednym z efektów jest między innymi aktywacja transkrypcji genów kodujących Bcl-2 [17].



Rycina 4. Wpływ jonów litu na procesy sygnalizacji komórkowej na przykładzie przemian inozytolu w komórce.

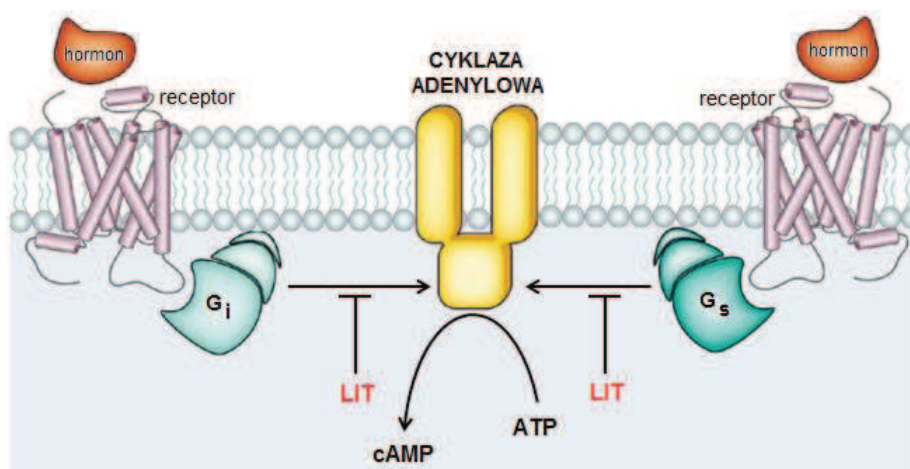


Rycina 5. Wpływ jonów litu na ścieżkę z udziałem GSK-3.

Lit wpływa też na regulację transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego z udziałem **kinaz białkowych C** (ang. *protein kinase C*, PKC). Lit powoduje gromadzenie się w wewnętrznej warstwie lipidowej komórki DAG, co prowadzi to do aktywacji PKC [18]. która wpływa między innymi na ufosforylowanie różnych białek cytoplazmatycznych, np. GAP-43 (ang. *growth associated protein 43*) oraz MARCKS (ang. *myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) przez co między innymi bierze udział w regulacji neuroplastyczności czyli procesów adaptacji tkanki nerwowej zarówno w kontekście neurochemicznym jak i zmian w morfologii komórek [18, 19].

Ponadto, sole litu regulują też komunikację między neuronami; wykazano, że pod wpływem litu dochodzi do wzrostu stężenia receptorów dla **kwasy γ -aminomasłowej** (GABA) w hipokampie, czego efektem jest hiperpolaryzacja błony postsynaptycznej [20]. Regulują też wychwytywanie zwrotne **glutaminianu**, jednego z głównych neuroprzekaźników pobudzających. Przewlekłe przyjmowanie przez pacjentów z CHAD związków litu podwyższa wychwyt zwrotny glutaminianu w synapsie [21].

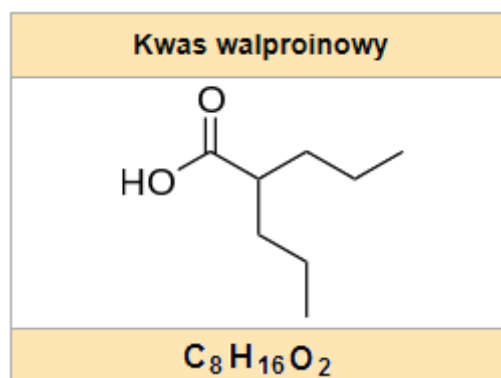
Lit kontroluje też produkcję **cyklicznego adenozynomonofosforanu** (cAMP), który jest również drugorzędowym przekaźnikiem biorący udział w transdukcji sygnału wewnątrz komórki, pełniąc przez to istotne funkcje w wielu procesach biologicznych [22]. cAMP powstaje pod wpływem cykazy adenylowej, na którą z kolei działa podjednostka białka G odłączająca się od receptora po związaniu np. z hormonem. W przypadku aktywacji białka receptorowego stymulującego (G_s) dochodzi do wzrostu cAMP, w przypadku inhibitorowego (G_i) – do spadku cAMP w komórce. Jony litu hamują przyłączanie się podjednostki białka G do cykazy w ten sposób w różny sposób regulują stężenia cAMP [22, 23]. Schemat działania litu na cyklazę adenyłową i powstawanie cAMP został przedstawiony na rycinie 6.



Rycina 6. Wpływ litu na powstawanie cAMP poprzez hamowanie białek G (G_i – inhibitorowa forma białka G, G_s – stymulująca forma białka G).

1.2.2. Kwas walproinowy – mechanizmy działania.

Kwas walproinowy (ang. *valproic acid*, VPA), inaczej kwas 2-propylooctowy jest organicznym związkiem chemicznym będącym rozgałęzionym nasyconym kwasem monokarboksylowym (Ryc. 7). Początkowo znalazł zastosowanie jako lek przeciwpadaczkowy, jednak z czasem jego zastosowanie poszerzyło się również o działanie normotymiczne w leczeniu CHAD [24].



Rycina 7. Wzór strukturalny i sumaryczny kwasu walproinowego.

Mechanizm działania kwasu walproinowego, podobnie jak w przypadku węglanu litu, jest złożony i dotyczy wielu różnych procesów zachodzących w komórkach. Kwas walproinowy wpływa między innymi na **zmiany w stężeniach neurotransmiterów**, przede wszystkim GABA [25]. VPA zapobiega degradacji GABA poprzez hamowanie transaminazy GABA-ketoglutaranu i zwiększenie ilość dekarboksylazy kwasu glutaminowego, enzymu potrzebnego do jego syntezy [25]. Równocześnie stwierdzono, że kwas walproinowy powoduje zwiększenie gęstości oraz wrażliwości receptorów GABA [26]. Lek ten ponadto wpływa na syntezę serotoniny poprzez zwiększenie ilości wolnego L-tryptofanu oraz przyspieszenie eliminacji dopaminy w różnych partiach mózgu [26].

Kwas walproinowy wpływa też na **kanały napięciowo zależne**, czyli kanały transbłonowe wybiórcze dla danego jonu i reagujące na zmiany napięcia elektrycznego. Do kanałów napięciowo-zależnych zaliczamy kanały sodowe (Na⁺), potasowe (K⁺) i wapniowe (Ca²⁺). VPA blokuje napływ jonów Na⁺ do wnętrza komórki, nasilając równocześnie wypływ jonów K⁺ w ten sposób przyspieszając proces repolaryzacji komórki [26]. Kwas walproinowy powoduje również blokadę kanałów wapniowych [26].

Wykazano też, że VPA osłabia sygnały zależne od receptorów kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), które odgrywa znaczącą rolę w funkcjonowaniu mózgu [26]. NMDA jest odpowiedzialny między innymi za jego rozwój, uczenie się i pamięć. Receptory te bramkowane mogą być zarówno przez ligand jak i napięcie; są też przepuszczalne dla jonów Na⁺, K⁺, Ca²⁺. Odgrywają one

rolę w procesach patologicznych, takich jak np. epilepsja [27] a pierwotne zastosowanie VPA założy właśnie w leczeniu tej choroby.

Ponadto, kwas walproinowy bierze, podobnie jak węglan litu, udział w regulacji **metabolizmu inozytolu**. Hamuje działanie syntazy inozytolu, która bierze udział w powstawaniu monofosforanu inozytolu z glukozy-6-fosforanu, powodując spadek poziomu komórkowego inozytolu [15]. VPA, podobnie jak lit, wpływa też hamująco na transporter SMIT (ang. *sodium-myo-inositol co-transporter*), czego efektem jest zahamowanie napływu do komórki inozytolu zewnątrzkomórkowego [15]. Wpływając na przemianę inozytolu kwas walproinowy powoduje spadek poziomu DAG tym samym hamując aktywność PKC i fosforylację MARCKS (ang. *myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*), czyli jest to efekt odwrotny do działania litu [28].

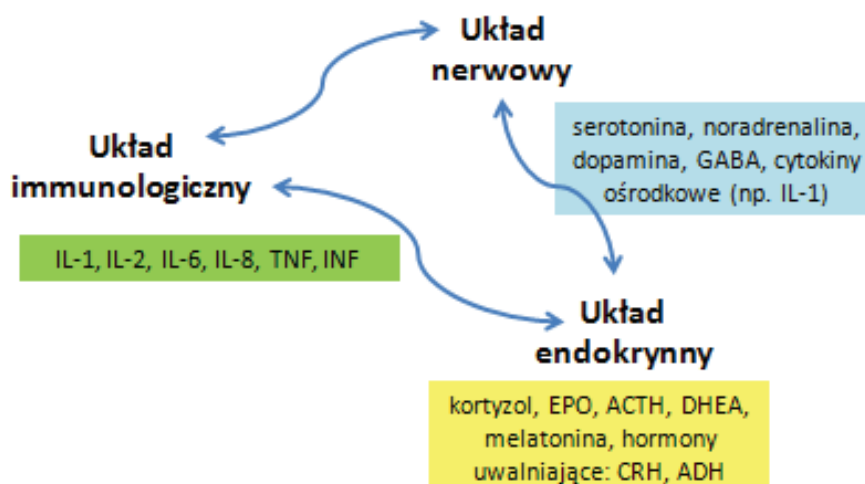
Kwas walproinowy jest również inhibitorem deacetylazy histonowej (ang. *histone deacetylase*, HDAC), przez co rośnie zainteresowanie jego użyciem przy wspomaganiu terapii nowotworów litych oraz hematologicznych [29]; jako inhibitor HDAC, VPA hamuje przebieg cyklu komórkowego [29].

VPA, podobnie jak węglan litu, wpływa na ścieżkę sygnalizacji z udziałem GSK-3, czego efektem jest stymulacja β -kateniny [28]. Reguluje również ścieżkę z udziałem ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) /MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*), która wpływa na transkrypcję kilku ważnych czynników transkrypcyjnych, jak CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*) oraz Ap-1 (ang. *activator protein 1*). Dzięki temu odgrywa ważną rolę w utrzymaniu plastyczności synaptycznej [28].

1.3. Powiązanie pomiędzy układem nerwowym, endokrynnym a immunologicznym.

Psychoneuroimmunologia to interdyscyplinarna gałąź nauk biomedycznych, której początki notuje się na lata 80-te XX wieku [30]. Zajmuje się ona badaniem wzajemnych powiązań trzech głównych układów: nerwowego, endokrynnego i immunologicznego (Ryc. 8) oraz ich interakcji z psychiką (głównie stresem i jego konsekwencjami) [30].

Zdolność wspólnego porozumiewania się układów nerwowego, endokrynnego oraz immunologicznego sprawia, że dzięki produkcji przez te układy różnych chemicznych mediatorów oraz obecności receptorów dla nich, układy te komunikują się ze sobą i stoją na straży homeostazy całego organizmu [31, 32].



Rycina 8. Schemat wzajemnych zależności pomiędzy układami: nerwowym, endokrynnym i immunologicznym.

Układ nerwowy, odpornościowy i hormonalny porozumiewają się na trzy główne sposoby [33]:

- poprzez unerwienie tkanek limfoidalnych;
- poprzez działanie hormonów na komórki układu immunologicznego;
- poprzez produkcję cytokin i ich wpływ na układ nerwowy [34].

1.3.1. Unerwienie tkanek limfoidalnych.

Autonomiczny układ nerwowy unerwia bezpośrednio większość tkanek limfoidalnych; limfocyty i makrofagi mają na swojej powierzchni receptory dla neurotransmiterów produkowanych przez komórki nerwowe; są to receptory noradrenergiczne, cholinergiczne i peptyderygiczne [34]. Komórki te tworzą przez to „synapsy neuroimmunologiczne”. Komunikacja między układem nerwowym a immunologicznym jest oczywiście obustronna [34].

Rozpoznawanymi przez limfocyty chemicznymi mediatorami uwalnianymi przez komórki nerwowe, są np. noradrenalina, dopamina, adrenalina, GABA, acetylocholina, i peptydy (substancja P, naczynioruchowy peptyd jelitowy, somatostatyna, neuropeptyd Y) [34, 35].

Noradrenalina działa na komórki układu odpornościowego poprzez receptory β_2 -adrenergiczne zmniejszając między innymi proliferację limfocytów T oraz produkcję interleukiny 2 (IL-2) oraz czynnika martwicy guza (ang. tumor necrosis factor, TNF- α) [35]. Noradrenalina hamuje podziały tymocytów, prekursorów limfocytów T, oraz zwiększa ekspresję antygenów powierzchniowych istotnych w procesie dojrzewania tych komórek [35, 36]. Badania potwierdzają, że stymulacja receptorów β_2 -adrenergicznych powoduje spadek stymulowanej mitogenem lub monoklonalnym przeciwciałem anti-CD3 proliferacji pomocniczych limfocytów T CD4⁺ (ang. *helper T cell*, T_h) in vitro [37]. Noradrenalina powoduje też zahamowanie procesu aktywacji naiwnych cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ (ang. *cytotoxic T cell*, T_c) przy jednoczesnej stymulacji ich migracji [38].

Noradrenalina ma wpływ też na aktywność cytotoksyczną komórek NK (ang. *natural killers*), między innymi poprzez hamowanie ich dojrzewania oraz różnicowania czy rozpoznawania komórek docelowych [39]. Zmniejsza też produkcję różnych cytokin, np. TNF- α , interferonu- γ (IFN- γ) oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) GM-CSF [40], w ten sposób upośledzając naturalną odporność komórkową.

Kwas γ -aminomasłowy (GABA) zmniejsza proliferację limfocytów T in vitro [41], co jest najprawdopodobniej wynikiem obniżenia produkcji IL-2 pod wpływem tego mediatora [42].

Substancja P, zaliczana do głównych neurotransmiterów organizmu, stymuluje proliferację limfocytów T oraz produkcję immunoglobulin przez limfocyty B [38]. Ponadto, substancja P zwiększa też produkcję IL-2 przez limfocyty, oraz IL-1 i TNF- α przez makrofagi i neutrofile [35]. Substancji P przypisuje się również zmniejszenie aktywności migracyjnej stymulowanych limfocytów T CD8⁺ a zwiększenie w przypadku komórek nieaktywowanych [38].

Naczynioruchowy peptyd jelitowy (ang. *vasoactive intestinal peptide*, VIP) jest neuropeptydem o działaniu plejotropowym, pełniącym funkcję neuroprzekaźnika i neuromodulatora [43]. Wpływa na zachowanie homeostazy ustrojowej regulując funkcjonowanie układu immunologicznego; działa przeciwzapalnie, cytoprotekcyjnie oraz immunomodulacyjnie [43]. VIP hamuje apoptozę dojrzałych limfocytów stymulowanych antygenem oraz cytotoksyczne działania limfocytów T CD8⁺. Hamuje też ekspresję antygenu CD95L (FasL) na limfocytach, czego efektem jest mniejsza podatność na apoptozę [44, 45]. VIP zmniejsza też wydzielanie IL-7, przez co wpływa między innymi hamująco na proces różnicowania się limfocytów B w szpiku [46]. Ponadto, VIP hamuje syntezę cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6) przez makrofagi a także proces fagocytozy oraz nasila uwalnianie IL-10; w ten sposób zapobiega niekontrolowanemu rozwojowi reakcji zapalnej [47, 48].

1.3.2. Wpływ hormonów na komórki układu immunologicznego.

Układ hormonalny może pośredniczyć w oddziaływaniu układu nerwowego na funkcje komórek układu odpornościowego, w ten sposób utrzymując homeostazę organizmu. Najczęściej wymienianym powiązaniem pomiędzy układem nerwowym a endokrynnym, mającym ostatecznie wpływ także na układ immunologiczny, jest oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. Kortykosteroidy produkowane przez korę nadnerczy wywierają silne działanie przeciwzapalne; między innymi indukują proces apoptozy (programowanej śmierci komórkowej) limfocytów, hamują uwalnianie cytokin prozapalnych, zwiększają też stężenie antyzapalnej IL-10 [49]. Za główny hormon stresu uważany jest kortyzol, który jest odpowiedzialny za zmniejszenie aktywności komórek NK w stresie, zmiany w proporcjach poszczególnych populacji limfocytów oraz zmniejszenie produkcji przeciwciał [49]. Uważa się, że zmiany te są odpowiedzialne za obserwowane w warunkach stresu zaburzenia odpowiedzi na szczepienia oraz wzmożoną progresję zmian nowotworowych [50].

1.3.3. Rola cytokin i ich wpływ na komórki układu nerwowego.

Cytokiny stanowią zróżnicowaną grupę białek działających jako cząsteczki sygnalizacyjne pomiędzy komórkami i regulują działanie układu odpornościowego. Odgrywają one znaczącą rolę w mediowaniu procesu zapalenia oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej [35]. Niektóre z nich biorą też udział w hematopoezie (np. IL-3 czy IL-5). Cytokiny stanowią istotny element odpowiedzi organizmu na uszkodzenia i zakażenia. W układzie odpornościowym pełnią one analogiczną funkcję co hormony w układzie endokrynnym, stąd określane są czasem mianem „hormonów układu odpornościowego” [35]. Dwoma najważniejszymi cechami cytokin jest pleiotropia oraz redundancja (termin oznaczający, że różne cytokiny mogą pełnić podobną funkcję). Działanie cytokin często przebiega w formie kaskady, tj. indukcja wczesnych cytokin prowadzi do zwiększenia produkcji tzw. cytokin późnych [35, 51].

Cytokiny możemy podzielić ze względu na ich właściwości na trzy grupy [51]:

- cytokiny o działaniu prozapalnym, (np. IL-1, IL-2, IL-17A, TNF- α , IFN), które inicjują i podtrzymują miejscowy stan zapalny oraz pomagają w eliminacji patogenów;
- cytokiny o działaniu przeciwzapalnym (np. IL-4, IL-10, IL-13), które zmniejszają odpowiedź zapalną poprzez obniżanie poziomu cytokin prozapalnych, przykładowo, IL-10 blokuje produkcję cytokin zapalnych przez limfocyty T;
- cytokiny wykazujące zarówno działanie prozapalne jak i przeciwzapalne, do których zaliczane są np. IL-6 czy IL-8 (IL-8 jest chemokiną, która bierze udział w rekrutacji

neutrofilów do miejsc, gdzie toczy się proces zapalny, ale w krwioobiegu wysokie poziomy tej cytokiny powodują zmniejszenie migracji neutrofili do miejsc zapalnych).

Początkowo sądzono, że cytokiny są produkowane jedynie przez komórki układu immunologicznego. Okazuje się jednak, że zdolność do ich syntetyzowania posiadają również keratynocyty, miocyty i fibroblasty a także komórki układu nerwowego (neurony i komórki glejowe), które produkują cytokiny pod wpływem bodźców zarówno obwodowych jak i ośrodkowych [52]. Cytokiny przedostają się do układu nerwowego pomimo istnienia bariery krew-mózg, co jest możliwe między innymi dzięki istnieniu transportu ułatwionego, a także w miejscach pozbawionych bariery krew-mózg lub krew-płyn mózgowy rdzeniowy [51, 52]. Wiele cytokin jest także syntetyzowanych i uwalnianych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Stwierdzono, że IL-1 jest obecna w hipokampie oraz w niektórych strukturach podwzgórza, takich jak jądro przykomorowe oraz łukowate [51]. W mózgu znajdują się również receptory dla wielu cytokin [51].

Poniżej przedstawiono przykłady efektów działania niektórych cytokin na funkcje układu nerwowego.

IL-1 jest to cytokiną o charakterze prozapalnym, która wykazuje też znaczne działanie psychotropowe [35, 51]. Bierze udział w powstaniu gorączki i utraty apetytu, które towarzyszą stanom zapalnym. Jest produkowana głównie przez monocyty/makrofagi, jednak zdolność do jej produkcji posiadają również limfocyty, śródbłonek, keratynocyty, a w układzie nerwowym również astrocyty i komórki mikrogleju [35, 51]. Astrocyty, pobudzone przez IL-1, produkują czynnik stymulujący kolonie (ang. *colony-stimulating factor*, CSF), TNF oraz IL-6 [51]. Z kolei, podawanie IL-1 prowadzi do wzrostu poziomu kortykoliberyny (ang. *corticotropin-releasing hormone*, CRH), a w konsekwencji kortykotropiny (ang. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) i kortykosteroidów [51]. Cytokina ta zaliczana jest również do substancji chemicznych regulujących proces snu i czuwania. Wzrost stężenia IL-1 zaobserwowano u pacjentów z depresją, zarówno w surowicy, jak i w badaniach in vitro [32, 51].

Ponadto, IL-1 stymuluje apoptozę neuronów [53]. W badaniach na gryzoniach wykazano, że cytokina ta wywołuje zachowania depresyjne oraz wykazuje działanie anty-neurogenne [53]. W badaniach nad chorobą Parkinsona, w modelu zwierzęcym wykazano, że przewlekła ekspresja IL-1 β powoduje śmierć neuronów dopaminergicznych [54]. W innych badaniach wykazano, że ogólnoustrojowe podawanie IL-1 szczurom prowadzi do zwiększenia poziomu dopaminy, noradrenaliny oraz 5-hydroksytryptaminy (serotoniny) w jądrach podwzgórza oraz hipokampie [55].

IL-17A zaliczana jest do silnych cytokin prozapalnych produkowanych przez limfocyty T tzw.Th17 w początkowych fazach odpowiedzi immunologicznej [56]. Pełni ona ważną rolę w

reakcjach skierowanych przeciwko bakteriom oraz grzybom, gdyż pod jej wpływem dochodzi do mobilizacji neutrofili [56]. Odgrywa ona również ważną rolę w przebiegu chorób autoimmunologicznych wpływając między innymi na strukturę i funkcje układu nerwowego. W wyniku pojawienia się stanu zapalnego w mózgu dochodzi do przenikania przez barierę krew-mózg limfocytów, które produkują IL-17A, co dodatkowo zwiększa przepuszczalność bariery i dalszą aktywację limfocytów T [57]. Pod wpływem IL-17A dochodzi do uwalniania białka chemotaktycznego dla monocytów, rekrutacji makrofagów oraz wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu. Jest ona nie tylko uwalniana przez limfocyty T, ale także komórki mikrogleju. Jej ekspresję zaobserwowano w korze mózgowej, hipokampie oraz w rdzeniu kręgowym [56, 57].

TNF- α jest jedna z najważniejszych cytokin zaliczanych do grupy cytokin prozapalnych. U pacjentów chorych na chorobę Alzheimera wykazano, że jej stężenie wzrasta, zarówno w surowicy, jak i ekstraktach tkanki mózgowej pacjentów [51, 58]. TNF- α jest podawany osobom leczonym na niektóre typy nowotworów; u pacjentów tych często obserwuje się występowanie neurologicznych objawów ubocznych takich jak: anoreksja, nudności, bóle głowy czy zmęczenie [51].

Z kolei, **IL-10** wykazuje działanie neuroprotekcyjne, co wykazano w doświadczeniach na mózgu szczurów [53]. Hamuje ona indukowaną lipopolisacharydem (LPS) apoptozę komórek mikrogleju i równocześnie zmniejsza wytwarzanie TNF- α przez te komórki [53]. Stwierdzono, że leki przeciwdepresyjne należące do różnych grup (inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, leki trójpierścieniowe oraz heterocykliczne) stymulują wydzielanie IL-10 i zmniejszają stosunek IFN γ /IL-10 [59].

IL-6, cytokina o działaniu prozapalnym, jak i antyzapalnym, aktywuje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza zwiększając tym samym stężenie kortykosteroidów [55]. Wykazano, że IL-6 zwiększa też neurotransmisję serotonergiczną w hipokampie mózgu szczura oraz w korze czołowej jednocześnie zmniejszając stężenie dopaminy [55]. Wzrost stężenia IL-6 obserwowany jest u pacjentów z depresją oraz chorych na chorobę Alzheimera; w tej ostatniej IL-6 zwiększa syntezę prekursorów amyloidu [51, 58].

1.4. Zaburzenia immunologiczne w chorobie afektywnej dwubiegunowej.

U pacjentów z CHAD obserwuje się zakłócenie pracy układu odpornościowego przejawiające się między innymi zwiększonym występowaniem w tej grupie chorych nowotworów czy chorób autoimmunizacyjnych [60]. Nieznane jest jednak dokładnie podłoże zaburzeń układu immunologicznego.

Zaburzenia w funkcjonowaniu układu immunologicznego w CHAD mają swoje odzwierciedlenie między innymi w ekspresji antygenów powierzchniowych limfocytów. Antygeny te nie tylko pozwalają na wyróżnienie różnych ich populacji, ale mają też wpływ na proliferację a także podatność na apoptozę [35]. Ponieważ choroby psychiczne zaburzają homeostazę organizmu, może mieć to wpływ na fenotyp limfocytów. I tak, u pacjentów z CHAD stwierdza się wzrost odsetka limfocytów T charakteryzujących się obecnością antygeny CD25 (ang. *cluster of differentiation 25*) [61], który stanowi podjednostkę alfa receptora dla interleukiny 2 (IL-2R), obecnego między innymi na aktywowanych limfocytach T i B [61]. Antygen CD25 nasila aktywność proliferacyjną stymulowanego limfocytu w obecności IL-2. Pacjenci ci charakteryzują się też większym odsetkiem komórek CD71⁺ [61]; CD71 jest receptorem trasferynowym odpowiedzialnym za transport żelaza do wnętrza komórek [35]. Wyniki te sugerują, że w przebiegu CHAD może dochodzić do aktywacji limfocytów T.

U pacjentów z CHAD znajdujących się w fazie maniakalnej obserwuje się ponadto wzrost rozpuszczalnego receptora dla IL-2 (ang. *soluble IL-2 receptor*, sIL-2R) [62]. Z tego też względu sugeruje się, że stan układu immunologicznego może być zależny od fazy choroby. W fazie maniakalnej wykazano wzrost stężenia cytokin takich jak IL-2, IL-4, IL-6 w porównaniu z osobami zdrowymi. Z kolei, w fazie depresyjnej wzrastał jedynie poziom IL-6 [63]. Inne badania wykazały również spadek produkcji INF- γ u osób chorych z CHAD [63].

Jak można zauważyć, nie ma dokładnych badań, które by oceniały funkcjonowanie limfocytów w przebiegu CHAD, w szczególności ich zdolność do proliferacji oraz podatność na apoptozę. O ile proliferacja limfocytów jest kluczowa dla prawidłowej odpowiedzi układu odpornościowego na obce antygeny, z którymi organizm ma do czynienia, to apoptoza ma istotne znaczenie dla ograniczenia procesu zapalnego.

1.5. Znaczenie procesu apoptozy w chorobie afektywnej dwubiegunowej.

1.5.1. Apoptoza – pojęcia podstawowe.

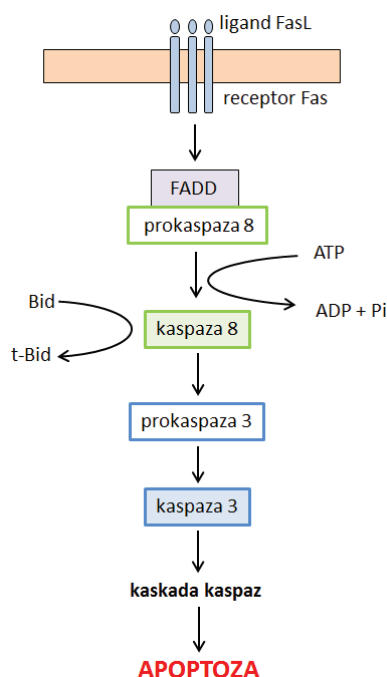
Terminu „apoptoza” jako pierwsi użyli Kerr, Wyllie oraz Currie w roku 1972 opisując proces śmierci komórki, który jest zaprogramowaną genetycznie sekwencją przemian morfologicznych i biochemicznych [64]. Apoptoza jest procesem fizjologicznym i służy eliminacji komórek bez wywoływania reakcji zapalnej. Zachowanie równowagi pomiędzy apoptozą a proliferacją komórek gwarantuje też utrzymanie homeostazy organizmu [64]. Jedną z głównych ról apoptozy jest uczestniczenie w procesach morfogenezy w trakcie rozwoju zarodkowego oraz stanowi ona mechanizm pozbywania się komórek uszkodzonych lub zbytecznych [51, 52].

Proces apoptozy ma charakter wieloetapowy i jest związany ze zmianami morfologicznymi komórek, które w konsekwencji prowadzą do tworzenia się ciałek apoptotycznych zawierających fragmenty jądra komórkowego, cytoplazmy z organellami komórkowymi. Ciałka apoptotyczne następnie są fagocytowane przez makrofagi, który rozpoznają je dzięki obecnej w zewnętrznej monowarstwie błony komórkowej fosfatydyloserynie [65, 66, 67].

Do aktywacji apoptozy może dochodzić dzięki aktywacji tzw. szlaku zewnętrznego lub wewnętrznego apoptozy.

Zewnętrzny szlak apoptozy jest aktywowany dzięki oddziaływaniu pomiędzy receptorami błonowymi (tzw. receptory śmierci) zaliczanymi do rodziny receptorów czynnika martwicy guza (TNF), między innymi TNFR1, TNFR2, Fas (CD95) a ich ligandami, np. TNF- α , FasL (CD95L) [68]. Receptory śmierci charakteryzują się obecnością zewnątrzkomórkowej domeny bogatej w cysteinę. Ich domeny wewnątrzcytoplazmatyczne, nazywane również domenami śmierci (ang. *death domain*, DD), składają się z około 80 aminokwasów i ich główną rolą jest przekazywanie sygnału do rozpoczęcia procesu apoptozy z powierzchni komórki do jej wnętrza. Najlepiej poznanym receptorem jest Fas; związanie receptora Fas z jego ligandem (FasL) powoduje przesłanie sygnału do białka adaptorowego FADD zawierającego na C-końcu domenę DD, którą wiąże się z domeną DD receptora Fas, oraz na N-końcu domenę efektorową śmierci (ang. *death effector domain*, DED) zdolną do związania prokaspazy 8. Prokaspaza 8 ulega aktywacji do kaspazy 8, czego konsekwencją jest uruchomienie kaskady kaspaz i zapoczątkowanie apoptozy (Rycina 9) [68, 69].

Kaspaza 8 jest również czynnikiem łączącym szlak zewnętrzny ze **szlakiem wewnętrznym (tzw. mitochondrialnym) apoptozy**. Powoduje ona proteolizę białka proapoptotycznego Bid do tBid (ang. *truncated Bid*), które powoduje uwalnianie cytochromu c z mitochondriów komórki, poprzez co aktywuje ścieżkę wewnętrzną apoptozy [68].

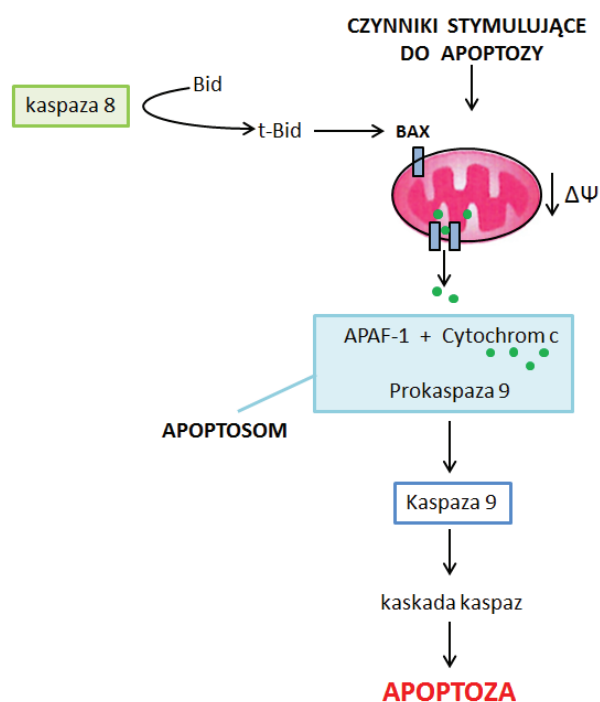


Rycina 9. Schemat zewnętrznego szlaku procesu apoptozy.

Do czynników aktywujących ścieżkę wewnętrzną zalicza się między innymi: promieniowanie, toksyny, niedotlenienie, stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA, hipertermię, zaburzenia transportu elektrolitów, wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie [68, 69]. Ścieżkę tą mogą też aktywować tzw. sygnały negatywne, czyli przykładowo brak niektórych czynników wzrostu, cytokin lub hormonów hamujących proces śmierci komórki [69].

Wymienione wyżej czynniki powodują zmiany w błonie mitochondriów, co prowadzi do otwarcia tzw. megakanalów obecnych w miejscach styku obu błon mitochondrialnych, spadku potencjału błonowego, oraz uwolnienia białek proapoptotycznych do cytoplazmy [69]. Istotną rolę w aktywacji ścieżki mitochondrialnej odgrywa białko Bax obecne w błonie mitochondrialnej, które aktywowane przez tBid oddziałuje wraz z poryną VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*), co zwiększa przepuszczalność błony mitochondrialnej (Rycina 10). Dzięki temu do cytoplazmy zostaje uwolniony cytochrom c, który wiążąc się z czynnikiem Apaf 1 tworzy tzw. apoptosom, który z kolei łączy się z prokaspazą 9 aktywując ją. Prowadzi to do kaskady kaspaz i procesu apoptozy [68, 69].

Aktywacja kaskady kaspaz prowadzi do proteolizy białek i zmian morfologicznych komórki, której są charakterystyczne dla procesu apoptozy [69].



Rycina 10. Schemat wewnętrznego (mitochondrialnego) szlaku procesu apoptozy.

1.5.2. Apoptoza neuronów w przebiegu niektórych schorzeń neuropsychiatrycznych.

Zaprogramowana śmierć komórki odgrywa ważną rolę podczas rozwoju centralnego układu nerwowego; dotyczy to przede wszystkim procesu zwanego synaptogenezą czyli tworzenia się połączeń synaptycznych umożliwiających wzajemną komunikację między neuronami mózgu [70, 71]. Formowanie się nowych synaps jest aktywowane w OUN przez trombospondyny – rodzinę glikoprotein uczestniczących w wielu procesach biologicznych, w szczególności istotnych podczas embriogenezy, kiedy dochodzi do rozwoju wielu narządów, w tym również mózgu [70]. W okresie poporodowym miejscem ich ekspresji są głównie astrocyty, komórki głojowe, które poza funkcją wspomagania działania neuronów (zaopatrzenia w glukozę, równomierny poziom potasu w neuronach, regulacja obecności neurotransmiterów w szczelinie synaptycznej, budowanie bariery krew-mózg), odgrywają też ważną rolę w regulacji tworzenia synaps oraz eliminacji komórek nerwowych [70]. Synaptogeneza następuje w OUN głównie po narodzinach [70, 71]. W ośrodkowym układzie nerwowym zarodka istnieje znaczna nadprodukcja neuronów, przyjmuje się że około 50% z nich ulega procesowi apoptozy w okresie rozwoju [71]. Po urodzeniu następuje tworzenie dodatkowych wypustek i synaps na drodze konkurencji; komórki, którym nie uda się utworzyć połączeń synaptycznych podlegają śmierci [72, 73]. Dzieje się to w pierwszych dwóch latach życia

oraz pomiędzy 8 a 15 rokiem życia [74]. Synaptogeneza odbywa się pod wpływem różnych neuroprzekaźników: glutaminy, acetylocholiny, dopaminy, GABA, glicyny, noradrenaliny. Regulują one produkcję czynników apoptotycznych, przez co wpływają na wzrost aksonów, dendrytów, stabilizują synapsy oraz wpływają na przeżycie neuronów [72].

Postępująca śmierć neuronów w niektórych strukturach mózgu leży u podstaw wielu chorób neurodegeneracyjnych. Jako przykład mogą posłużyć choroba Alzheimera czy Parkinsona. W chorobie Alzheimera, w której ubytki tkanki mózgowej mogą prowadzić do zmniejszenia masy mózgu w hipokampie do 45%, w płacie skroniowym do 15% a w ciele migdałowatym do 36%, złogi amyloidowe obecne pozakomórkowo w tkance oraz w ścianach naczyń, oraz sploty włókienek nerwowych (kłębki neurofibrylarne) odpowiedzialne są za degenerację neuronów [75]. Powyższe zmiany morfologiczne powodują, że w chorobie tej zanika około 40% zakończeń presynaptycznych, co prowadzi do zmniejszenia poziomów neurotransmiterów. Dochodzi do aktywacji mikrogleju i pojawienia się astrocytów w miejscach uszkodzeń wywołanych obecnością złogów amyloidowych. Wewnątrz neuronów obserwuje się liczne uszkodzenia materiału genetycznego, wzrost aktywności kaspaz i ekspresji genów białek proapoptotycznych [75]. Również w chorobie Parkinsona, w której zmiany w tkance mózgowej dotyczą głównie istoty czarnej, dochodzi do spadku dużej liczby neuronów dopaminergicznych w wyniku aktywacji procesu apoptozy [76]. W cytoplazmie neuronów istoty czarnej i miejsca sinawego stwierdza się obecność ciałek Lewy'ego, które są agregatami białek, np. α -synukleiny czy ubikwityny, której rola polega na naznaczaniu białek, które mają ulec nielizosomalnej proteolizie [27, 76, 77].

Podobnie choroby psychiczne takie jak choroba afektywna dwubiegunowa, depresja czy schizofrenia charakteryzują się zmianami w tkance mózgowej.

Za podstawową przyczynę zaburzeń nastroju u chorych z depresją uważa się zmiany neurochemiczne w mózgu. Jednak depresji towarzyszą też takie zmiany w OUN jak spadek objętości niektórych regionów mózgu, głównie hipokampa [78]. Narażenie na stresujące wydarzenia życiowe oraz stres przewlekły powodują zwiększenie ryzyka wystąpienia depresji. Stres aktywuje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza stymulując wydzielanie kortyzolu; przewlekła hiperkortykolemia wywiera niekorzystny wpływ na hipokamp indukując regresję wypustek dendrytycznych, hamuje neurogenezę, zmniejsza odporność na czynniki uszkodzające (niedotlenienie, hipoglikemia, stres oksydacyjny, neurotoksyczność), obniża poziom czynników neurotroficznych, co w końcowym efekcie aktywuje proces apoptozy [78].

Z kolei w CHAD, obrazowanie in vivo oraz badania post mortem wykazują atrofię mózgu ze zmniejszeniem grubości kory u pacjentów w porównaniu z osobami zdrowymi. Obserwuje się zmniejszenie liczby oraz wielkości neuronów i komórek gleju, co sugeruje udział procesu apoptozy w

patofizjologii CHAD. Co więcej, w pośmiertnym badaniu kory przedczołowej pacjentów wykazano spadek czynników antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2 i neurotrofowy czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) oraz markerów synaptycznych (synaptofizyna i drebrin) przy jednoczesnym znacznym wzroście czynników proapoptotycznych (Bax, kaspaza 9, kaspaza 3) [79].

1.5.3. Apoptoza limfocytów w przebiegu chorób psychicznych.

Zgodnie z teorią psychoneuroimmunologiczną dużą rolę w rozwoju chorób psychicznych przypisuje się komórkom układu immunologicznego. Z tego też względu można znaleźć publikacje, w których opisywana jest apoptoza limfocytów w przebiegu różnych chorób o podłożu neuropsychiatrycznym.

W chorobie Alzheimera, w której bada się limfocyty jako komórki modelowe procesów zachodzących w komórkach nerwowych, obserwuje się wzrost ekspresji receptora Fas oraz aktywności kaspaz 3, 6 i 8 w limfocytach CD4⁺ [80]. Konsekwencją jest indukcja apoptozy zarówno spontanicznej, jak i wywołanej stresem oksydacyjnym [80]. Z kolei, w schizofrenii wykazano, że znacząco wyższy poziom w surowicy receptora Fas oraz liganda Fas (FasL) pacjentów koreluje pozytywnie z aktywnością kaspazy 3 w limfocytach [81].

U pacjentów z depresją dochodzi do wzrostu odsetka limfocytów CD95⁺; jego wzrost zaobserwowano również na powierzchni neutrofili [82]. Co więcej, potwierdzono nasilenie apoptozy limfocytów CD4⁺ u tych chorych stosując barwienie komórek aneksyną V, która wiąże się z fosfatydyloseryną obecną na komórkach apoptotycznych w zewnętrznej warstwie błony komórkowej, oraz poprzez określenie potencjału mitochondrialnego jako wskaźnika rozpoczęcia się procesu śmierci komórki [83]. Wykazano również wzrost poziomu białka proapoptotycznego Bax w limfocytach oraz udowodniono wzrost poziomu cytochromu c w cytoplazmie tych komórek [83].

Podobne wyniki badań uzyskano również u pacjentów z CHAD. Z wielu badań dotyczących tej choroby wynika, że nasilony proces apoptozy dotyka nie tylko komórki mózgu, ale również limfocyty krwi obwodowej [84], co potwierdzono między innymi wykazując translokację białka Bax do mitochondriów oraz wzrost stężenia cytochromu c w cytoplazmie limfocytów chorych [85].

Podsumowując, można wyraźnie zauważyć, że mało jest wiadomo na temat zaburzeń układu odpornościowego, zwłaszcza w kontekście funkcjonowania limfocytów T, w chorobie afektywnej dwubiegunowej. Nieliczne badania dotyczące zmian w stężeniach cytokin, fenotypu czy nasilenia apoptozy limfocytów u pacjentów z CHAD pozostawiają pewien niedosyt. Jednocześnie zwraca się uwagę na to, że w chorobach o podłożu neuropsychiatrycznym takich jak depresja, CHAD czy schizofrenia, mogą istnieć pewne podobieństwa pomiędzy komórkami nerwowymi a limfocytami w zakresie ekspresji receptorów dla cytokin bądź neurotransmiterów i mechanizmach transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych [81]. Z tego też względu uważa się, że funkcjonowanie limfocytów mogłoby odzwierciedlać większość procesów zachodzących w komórkach nerwowych mózgu [86].

Rozwój technik z zakresu immunologii umożliwia obecnie wieloparametrową analizę funkcjonowania limfocytów T, również w grupie chorych z CHAD. Warto też zwrócić uwagę na to, że do tej pory nie zbadano wpływu stosowanych w leczeniu CHAD leków normotymicznych na funkcjonowanie limfocytów. Tymczasem pojawiające się w literaturze pojedyncze prace dotyczące komórek układu immunologicznego w kontekście tej choroby zachęcają do zbadania podstawowych parametrów limfocytów T, takich jak chociażby ich fenotyp powierzchniowy uwzględniający obecność markerów aktywacji (np. antygenu CD25) bądź antygenów ważnych dla interakcji z limfocytami B (np. antygen CD154). Istotne też było zbadanie u pacjentów z CHAD zdolności limfocytów T do proliferacji czy ich podatności na apoptozę, zwłaszcza w kontekście stosowanego leku normotymicznego. Zwłaszcza parametry proliferacyjne są ważnym wykładnikiem aktywacji tych komórek w odpowiedzi na stymulację antygenową a można je zbadać chociażby opisaną parę lat temu techniką cytometryczną DCT (ang. *Dividing Cell Tracking*), która pozwala śledzić podziały komórkowe z jednoczesną oceną fenotypu powierzchniowego badanej populacji [87]. Takie badania mogłyby nie tylko dostarczyć dodatkowych informacji o zmianach w funkcjonowaniu limfocytów T chorych z CHAD, ale pozwoliły ocenić wpływ stosowanych leków na powyższe parametry.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Jak wspomniano we Wstępie, istnieje dużo powiązań pomiędzy układem nerwowym a immunologicznym. Z tego też względu uważa się, że komórki układu immunologicznego nie tylko mogą odgrywać dużą rolę w rozwoju choroby afektywnej dwubiegunowej, ale też ich funkcjonowanie może odzwierciedlać zmiany w komórkach nerwowych w przebiegu tej choroby. Ponieważ wykorzystanie do badań nad zaburzeniami psychicznymi komórek mózgowych pochodzących z biopsji od żywych pacjentów jest z samego założenia nieetyczne, badania nad limfocytami mogą stanowić alternatywę dla badań nad komórkami nerwowymi, co może przyczynić się do rozszerzenia wiedzy na temat CHAD a także przyczynić się do rozwoju diagnostyki i terapii.

Zaburzenia układu odpornościowego w przebiegu CHAD nie są zbyt dobrze poznane a te, które zostały do tej pory opisane, nie zawsze są ze sobą zgodne, dlatego też wymagają dodatkowych, dokładniejszych badań. W szczególności, obecnie niewiele jest wiadomo na temat funkcjonowania limfocytów T u chorych na CHAD oraz o wpływie stosowanych leków normotymicznych na te komórki. Fenotyp limfocytów a także ich zdolność do proliferacji oraz podatność na apoptozę są kluczowymi cechami tych komórek, które świadczą o ich zdolności do prawidłowej odpowiedzi na obce antygeny, z którymi organizm ma na co dzień do czynienia.

W związku z tym głównymi celami prezentowanej pracy są:

1. Ocena fenotypu limfocytów T, między innymi pod kątem obecności wybranych markerów aktywacji, oraz analiza stężeń wybranych cytokin w surowicy pacjentów z CHAD, ze szczególnym uwzględnieniem fazy choroby a także stosowanych leków normotymicznych i porównanie uzyskanych wyników z wynikami osób zdrowych;
2. Analiza parametrów aktywności proliferacyjnej limfocytów $CD4^+$ oraz $CD8^+$ w obecności konkanawaliny A (ConA) i porównanie wyników pomiędzy chorymi a zdrowymi, w obecności i bez poszczególnych leków oraz w zależności od fazy choroby;
3. Ocena wpływu leków normotymicznych na apoptozę limfocytów T pacjentów z CHAD oraz limfocytów T zdrowej kontroli.
4. Ocena uniwersalności obserwowanego wpływu badanych leków normotymicznych na apoptozę limfocytów poprzez użycie komórek linii MOLT-4 uznawanej za modelowy limfocyt;

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Osoby badane

Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy (n=20), którzy wyrazili zgodę na uczestnictwo w badaniach (deklaracja świadomej zgody w załącznikach – załącznik nr 1). Dane demograficzne zawarto w Tabeli 1. Wszyscy zostali poinformowani o celach i konsekwencjach uczestniczenia w eksperymencie (informacja o badaniu – załącznik nr 2). W badaniu mogły brać udział osoby bez zaburzeń somatycznych oraz bez jakichkolwiek zaburzeń wpływających na układ immunologiczny. Cukrzyca, choroby o podłożu immunologicznym, choroba niedokrwienna serca, RZS wykluczały z uczestnictwa w badaniach. Również wszelkie zaburzenia psychiczne oraz występowanie choroby psychicznej w rodzinie dyskwalifikowały z uczestnictwa (formularz przyjęcia dla osoby badanej – załącznik nr 3). Przedział wiekowy ustalono na 25-65 lat.

Pacjenci (n=13), którzy uczestniczyli w badaniach cierpieli z powodu choroby afektywnej dwubiegunowej (CHAD) i byli hospitalizowani z tego powodu w Klinice Chorób Psychiczych i Zaburzeń Nerwicowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W eksperymencie brali udział także pacjenci Poradni Zdrowia Psychicznego działającej przy Uniwersyteckim Centrum Klinicznym. Do programu kwalifikowano pacjentów z rozpoznaniem choroby afektywnej dwubiegunowej (CHAD) w fazie depresji (n=6) lub w remisji (n=7) co określano na podstawie skali depresji Hamiltona i skali depresji Becka (załącznik nr 4). W celu wykluczenia fazy maniakalnej użyto skali manii Younga (załącznik nr 5). Charakterystykę demograficzną pacjentów i rozkład rozpoznań przedstawiono w tabeli 1. Stan psychiczny pacjentów był oceniany przez lekarza psychiatrę na podstawie formularza przyjęcia dla lekarza (załącznik nr 6). W badaniu brali udział tylko ci u których nie stwierdzono odchyleń somatycznych oraz chorób wynikających z zaburzeń układu immunologicznego. Przedział wiekowy kandydatów ustalono na 20-65 lat. Do badania włączono pacjentów przyjmujących lit lub kwas walproinowy. Pacjenci podobnie jak zdrowa kontrola wypełniali także formularz przyjęcia dla osoby badanej, podpisywali deklarację świadomej zgody, oraz zostali poinformowani pisemnie i ustnie o założeniach i celach badania.

Na przeprowadzenie badań wyraziła zgodę Niezależna Komisja Bioetyczna ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKEBN/365/2005). Ocena stanu somatycznego oraz psychicznego została przeprowadzona przy współpracy Kliniki Chorób Psychiczych i Zaburzeń Nerwicowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

		Pacjenci	Grupa kontrolna
Wiek		23-49 lat	21-58 lat
Płeć	K	4	12
	M	9	8
Rozpoznanie	Chad Remisja (K/M)	7 (0/7)	Nie dotyczy
	Chad Depresja (K/M)	6 (4/2)	Nie dotyczy
Przyjmowane leki	Węglan litu	7 (3-dep 4-rem)	Nie dotyczy
	Kwas walproinowy	6 (3-dep 3-rem)	Nie dotyczy

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna osób uczestniczących w badaniu; dep – depresja; rem – remisja;

3.2. Ocena aktualnego stanu psychicznego

Do oceny stanu psychicznego pacjentów zostały użyte skale wykorzystywane do diagnostyki i nasilenia zarówno fazy depresyjnej – Skala Depresji Becka, Skala Depresji Hamiltona jak i fazy maniakalnej – Skala Manii Younga.

3.2.1. Skala Depresji Becka (ang. *Beck Depression Inventory*)

Skala subiektywna, w skali tej pacjent samodzielnie odpowiada na 21 pytań (odpowiedzi punktowane od 0 do 3) dotyczących aktualnego nastroju. Stosowana jest w psychiatrii do diagnostyki depresji i jej nasilenia.

Przyjmuje się następującą punktację:

- 0-10 pkt - brak depresji lub obniżenie nastroju;
- 11-27 - depresja umiarkowana;
- 28 i więcej - depresja ciężka.

Istotnym uzupełnieniem Skali Depresji Becka jest badanie specjalisty i wykonanie przez niego Skali Depresji Hamiltona.

3.2.2. Skala Depresji Hamiltona (ang. *Hamilton Rating Scale for Depression*)

Skala Depresji Hamiltona służy do oceny zaburzeń depresyjnych, jednak w przeciwieństwie do Skali Depresji Becka nie jest wykonywany przez pacjenta a przez lekarza czyli jest testem w pełni obiektywnym.

Przyjmuje się następującą punktację:

- 0-7 pkt - brak depresji;
- 8-12 – depresja łagodna;
- 13-17 – depresja umiarkowana;
- 18-29 – ciężka depresja;
- 30-52 – bardzo ciężka depresja.

3.2.3. Skala Manii Według Younga (ang. *Young Rating Scale for Mania*)

Skala ta jest pomocna do oceny stopnia nasilenia manii oraz skuteczności leczenia psychotropowego. Stosuje się ją w diagnostyce choroby afektywnej dwubiegunowej przy ocenie fazy maniakalnej. Skala składa się z 11 pozycji (7 pozycji 0-4 pkt, 4 pozycje 0-8 pkt). Lekarz ocenia stopień nasilenia objawów na podstawie relacji pacjenta o swoim samopoczuciu z ostatnich 48 godzin.

Przyjmuje się że po uzyskaniu 25 punktów mamy do czynienia z ciężką manią, natomiast wynik poniżej 12 punktu oznacza remisję [88].

3.3. Ocena fenotypu, proliferacji oraz podatności na apoptozę limfocytów T osób zdrowych i chorych na CHAD metodą cytometrii przepływowej

3.3.1. Cytometria przepływowa

Jest to metoda ilościowa szybkiej analizy dużej liczby komórek w zawiesinie. Za jej pomocą możemy dokonać jednoczesnego pomiaru szeregu parametrów. Podstawą działania cytometru przepływowego jest pomiar rozproszenia światła przez badane komórki oraz emitowanej przez nie fluorescencji [89]. Oznaczone parametry możemy określić używając w analizie histogramów lub wykresów dwuparametrowych dot-plot. Za pomocą tych metod przedstawiania wyników oceniamy fenotyp komórek, parametry proliferacji oraz procesu apoptozy.

Pomiary cytometryczne zostały wykonane przy wsparciu Sieci Obrazowania Patologii Funkcji Komórek Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego a do ich wykonania posłużyły cytometry przepływowe FACScan oraz FACSVerse (Becton Dickinson, USA).

3.3.2. Materiał badany

Zarówno od chorych jak i zdrowych pobierano 30 ml krwi pełnej na EDTA (antykoagulant kwas etylenodiaminotetraoctowy) oraz 3 ml krwi na skrzep. Surowica była zbierana do probówek eppendorf po odwirowaniu przy prędkości 4000 obr./min. przez 10 minut i przechowywana w -20°C do czasu badania poziomu cytokin.

3.3.3. Ocena fenotypu limfocytów krwi obwodowej ex vivo

Fenotyp limfocytów oznaczany był we krwi obwodowej po uprzedniej lizie erytrocytów w hipotonicznym roztworze chlorku amonowego (0.83 g NH_4Cl , 0.1 g KHCO_3 w 100 ml wody destylowanej). Ocenione zostały odsetki limfocytów T ($\text{CD}3^+$) oraz subpopulacje limfocytów T – $\text{CD}4^+$ i $\text{CD}8^+$ z uwzględnieniem markerów powierzchniowych $\text{CD}25$, $\text{CD}197$, $\text{CD}154$. Do próbki badanej krwi w ilości 100 μl dodawano przeciwciała w ilości 5 μl w następujących kombinacjach:

- PE-Cy7 anty- $\text{CD}25$ / PE-Cy5 anty- $\text{CD}4$ / PE-CF594 anty- $\text{CD}197$ / APC-Cy7 anty- $\text{CD}3$;
- PE-Cy5 anty- $\text{CD}4$ / PE anty- $\text{CD}154$ / APC-Cy7 anty- $\text{CD}3$ / V500 anty- $\text{CD}8$;

Użyte przeciwciała pochodziły również od firmy Becton Dickinson. Komórki inkubowano 30 minut w ciemności, w lodzie. Po tym czasie komórki płukano roztworem PBS (100 ml PBS – roztworu macierzystego: 14.24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2.76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 87.60 g NaCl , 2 g NaN_3 w 1 l wody destylowanej, 2 g albuminy wołowej, uzupełnione do 1 l wodą destylowaną) poprzez wirowanie 5 minut przy 2000 obr./min. Następnie komórki zawieszano w PBS celem analizy cytometrycznej aparatem FACSVerse (Becton Dickinson, USA).

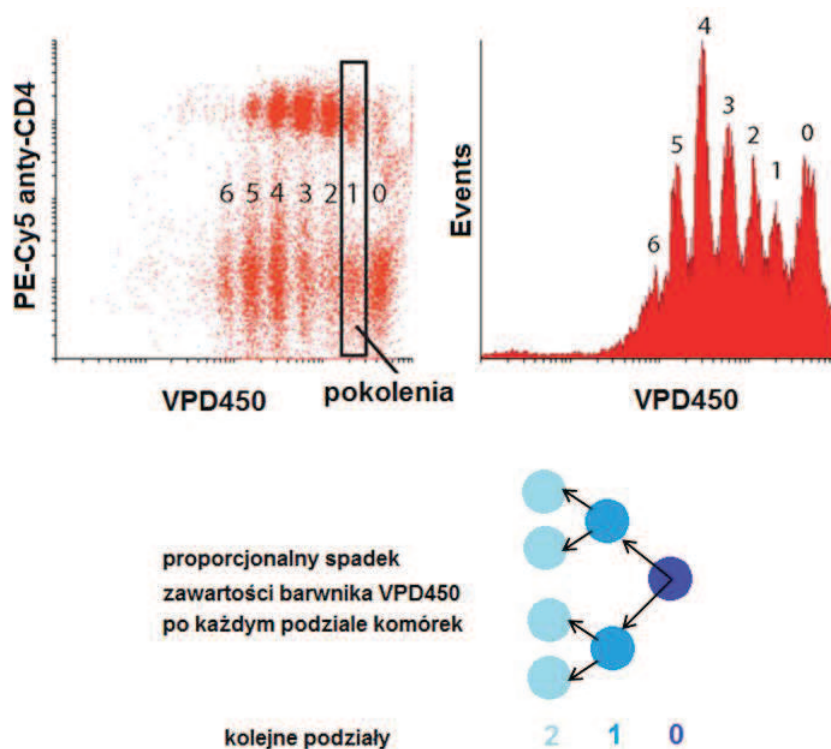
3.3.4. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) uzyskiwane były po uprzednim rozcieńczeniu krwi (w stosunku 1:1 w PBS) drogą wirowania krwi (30 minut 1000G) w gradiencie płynu do izolacji limfocytów o gęstości 1,077g/ml (Histopaque 1077, Sigma Chemical Co., USA). Uzyskane w ten sposób komórki (limfocyty i monocyty) były opłukiwane z płynu izolacyjnego a następnie zawieszanie w kompletnym środowisku hodowlanym złożonym z

medium RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., USA) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (Sigma Chemical Co., USA), 2 mM L-glutaminy (Sigma Chemical Co., USA) oraz antybiotyków: penicyliny w stężeniu 10 U/ml i streptomycyny w stężeniu 10 µg/ml (Sigma Chemical Co., USA).

3.3.5. Ocena dynamiki proliferacji limfocytów osób zdrowych i chorych w obecności badanych leków – węglanu litu oraz kwasu walproinowego

Dynamikę proliferacji limfocytów T i B oceniano metodą DCT (ang. *Dividing Cell Tracking*) opracowaną przez Hasbolda [90]. Metoda ta pozwala na śledzenie podziałów komórkowych badanych populacji dzięki zastosowaniu barwnika Violet Proliferation Dye 450 (VPD450, Becton Dickinson, USA), który przenika do komórek i zostaje w nich unieruchomiony na skutek hydrolizy przez esterazy cytoplazmatyczne. Komórki dzieląc się rozdzielają wybarwione przez VPD450 białka pomiędzy komórki potomne, których fluorescencja ulega zmniejszeniu o połowę w każdym powstającym pokoleniu (Rycina 11.).



Rycina 11. Ilościowe oznaczanie komórek proliferujących za pomocą DCT. Zarówno histogram jak i dot-plot przedstawiają poszczególne pokolenia komórek po 72h stymulacji konkanawaliną A wybarwionych za pomocą VPD450.

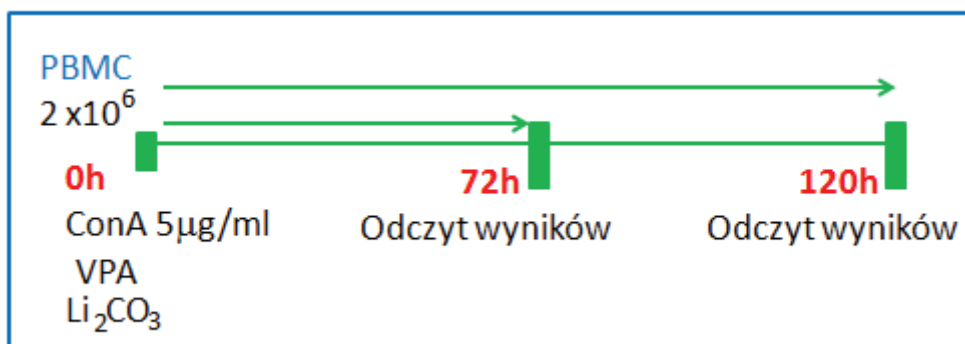
PBMC w ilości 24 milionów zawieszonych w 1 ml PBS były najpierw inkubowane przez 15 min z barwnikiem VPD450 w stężeniu $1 \mu\text{M}$ w temperaturze 37°C . Następnie komórki odpłukiwano z nadmiaru barwnika. Tak przygotowane PBMC hodowane były na sterylnej płytce 24-dołkowej (24 Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated, USA) w wyjściowym stężeniu $2 \times 10^6/\text{ml}$ w kompletnym środowisku hodowlanym. Komórki były stymulowane konkanawaliną A w stężeniu $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma Chemical Co., USA) w obecności różnych stężeń węglanu litu lub kwasu walproinowego w temperaturze 37°C , w atmosferze zawierającej 5% CO_2 , w 100% wilgotności przez 5 dni. Szczegółowy rozkład płytki hodowlanej i schemat doświadczenia przedstawiono na rycinie 12 i 13.

Komórki pobierano w 72 i 120 godzinie hodowli, płukane roztworem PBS oraz liczone. Następnie komórki były inkubowane z przeciwciałami APC-Cy7 anty-CD3, PE-Cy5 anty-CD4, V500 anty-CD8 oraz APC-H7 anty-CD19) a następnie analizowane cytometrycznie na FACSVerse (Becton Dickinson, USA).

Analiza wyników proliferacji była dokonywana przy użyciu programu PROGENY autorstwa prof. Jacka Witkowskiego (podrozdział 3.5).

Węglan litu 0mM 72h	Węglan litu 2mM 72h	Węglan litu 5mM 72h			
Węglan litu 0mM 120h	Węglan litu 2mM 120h	Węglan litu 5mM 120h			
VPA 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 72h	VPA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 72h	VPA 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 72h			
VPA 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 120h	VPA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 120h	VPA 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 120h			

Rycina 12. Schemat płytki hodowlanej przy ocenie dynamiki proliferacji.



Rycina 13. Schemat doświadczenia badającego dynamikę proliferacji PBMC zdrowych i chorych w czasie.

3.3.6. Indukcja apoptozy i jej modulacja przy pomocy badanych leków w hodowlach PBMC osób zdrowych oraz pacjentów

Komórki zawieszane były w stężeniu $5 \times 10^5/\text{ml}$ w kompletnym środowisku hodowlanym i stymulowane konkanawaliną A w stężeniu $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ na płytce 24-dołkowej. Następnie komórki inkubowano w temperaturze 37°C , w atmosferze zawierającej 5% CO_2 i w 100% wilgotności przez 24 godziny.

W celu indukcji apoptozy używane były dwie substancje o odmiennym mechanizmie wywoływania procesu apoptozy w komórkach:

- nadtlenek wodoru w stężeniu $220 \mu\text{M}$;
- kamptotecyna w stężeniu $1 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Po 24 godzinach do hodowli PBMC z osób zdrowych dodawano czynniki wywołujące apoptozę oraz kwas walproinowy (Rycina 14.) lub węglanu litu w wybranych stężeniach (Rycina 15). Do hodowli komórek wyizolowanych od pacjentów dodawano tylko ten lek, który pacjent wcześniej otrzymywał, tzn. komórki pacjentów przyjmujących węglu litu hodowane były tylko w obecności wybranych stężeń węglanu litu, a komórki pobrane od pacjentów otrzymujących kwas walproinowy tylko w obecności wybranych stężeń tego leku. Po kolejnych 72 godzinach komórki były zbierane i znakowane barwnikiem JC-1 ($2 \text{mg}/\text{ml}$, Calbiochem, Niemcy) lub aneksyną V (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche, Szwajcaria) a następnie analizowane za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu FACScan (Becton Dickinson, USA).

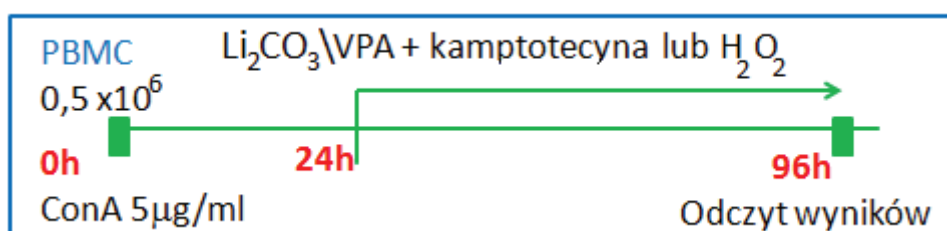
Schemat doświadczenia przedstawiono na Rycinie 16.

VPA $0 \mu\text{g}/\text{ml}$	VPA $50 \mu\text{g}/\text{ml}$	VPA $100 \mu\text{g}/\text{ml}$	VPA $120 \mu\text{g}/\text{ml}$	VPA $200 \mu\text{g}/\text{ml}$	VPA $300 \mu\text{g}/\text{ml}$
VPA $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ + KAMPTO	VPA $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ + KAMPTO	VPA $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ + KAMPTO	VPA $120 \mu\text{g}/\text{ml}$ + KAMPTO	VPA $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ + KAMPTO	VPA $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ + KAMPTO
VPA $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ + H_2O_2	VPA $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ + H_2O_2	VPA $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ + H_2O_2	VPA $120 \mu\text{g}/\text{ml}$ + H_2O_2	VPA $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ + H_2O_2	VPA $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ + H_2O_2

Rycina 14. Schemat płytki hodowlanej używanej do oceny apoptozy w obecności kwasu walproinowego.

Węglan litu 0mM	Węglan litu 1mM	Węglan litu 2mM	Węglan litu 3mM	Węglan litu 4mM	Węglan litu 5mM
Węglan litu 0mM + KAMPTO	Węglan litu 1mM + KAMPTO	Węglan litu 2mM + KAMPTO	Węglan litu 3mM + KAMPTO	Węglan litu 4mM + KAMPTO	Węglan litu 5mM + KAMPTO
Węglan litu 0mM + H2O2	Węglan litu 1mM + H2O2	Węglan litu 2mM + H2O2	Węglan litu 3mM + H2O2	Węglan litu 4mM + H2O2	Węglan litu 5mM + H2O2

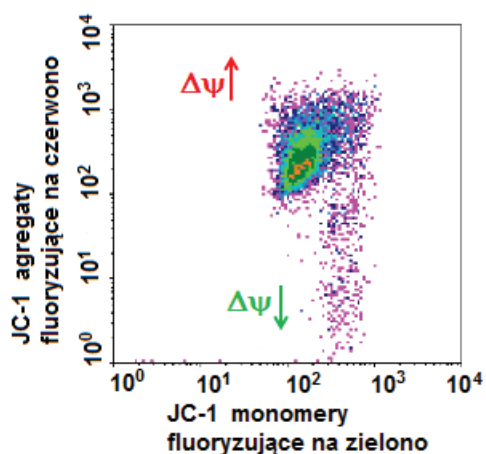
Rycina 15. Schemat płytki hodowlanej używanej do oceny apoptozy w obecności węglanu litu. KAMPTO – kamptoteczyna; H2O2 – nadtlenek wodoru;



Rycina 16. Schemat doświadczenia badającego proces apoptozy PBMC zdrowych i chorych w czasie.

3.3.7. Metody oceny apoptozy

Do oznaczania tzw. ścieżki wewnętrznej apoptozy, w której kluczową rolę odgrywa depolaryzacja mitochondriów [91] wykorzystuje się barwnik JC1 ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{Cl}_4\text{IN}_4$), tzw. sondę potencjału mitochondrialnego [92]. Barwnik ten tworzy agregaty (fluoryzujące czerwono) jedynie w komórkach posiadających nieuszkodzone mitochondria o wysokim potencjale elektrycznym błony ($\Delta\Psi_m$) (Rycina 17.). W przypadku apoptozy komórki mitochondria są zdepolaryzowane i JC1 będzie tworzył monomery o fluorescencji zielonej. Obydwa typy fluorescencji są równocześnie wykrywane w badanych komórkach podczas analizy cytometrycznej.

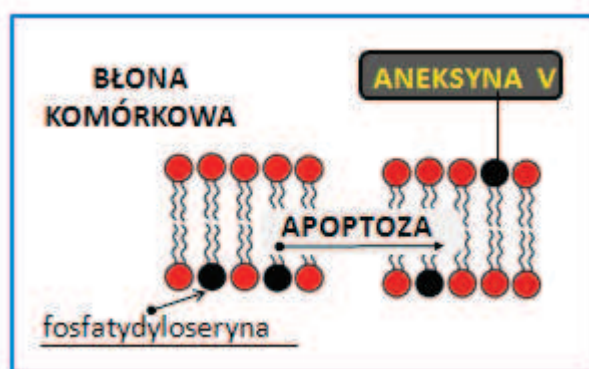


Rycina 17. Przykładowy dot-plot z cytometrii przepływowej uzyskany podczas oznaczania apoptozy metodą barwienia JC-1.

$\Delta\Psi \uparrow$ - komórki żywe z wysokim potencjałem mitochondrialnym

$\Delta\Psi \downarrow$ - komórki wchodzące na drogę apoptozy z niskim potencjałem mitochondrialnym

Cechą charakterystyczną procesu apoptozy są zmiany zachodzące w budowie błony komórkowej. Dochodzi wówczas do zaburzenia asymetrii w rozmieszczeniu fosfolipidów błonowych. W normalnej komórce na powierzchni błony przeważają fosfolipidy obojętne, do których zalicza się: sfingomielinę i fosfatydylocholinę, podczas gdy w warstwie wewnętrznej zaś dominują fosfolipidy anionowe, takie jak fosfatydyloseryna [95]. W komórkach apoptotycznych fosfatydyloseryna jest eksponowana w zewnętrznej warstwie błony komórkowej. Zjawisko to wykorzystuje się do znakowania komórek apoptotycznych za pośrednictwem aneksyny V, która ma zdolność do wiązania się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, takimi jak fosfatydyloseryna [94, 95] (Rycina 18).



Rycina 18. Zmiany zachodzące w błonie komórkowej podczas apoptozy i prowadzące do wiązania się fosfatydyloseryny z aneksyną wykrywaną podczas odczytu cytometrycznego.

3.3.8. Ocena poziomu cytokin w surowicy krwi

Stężenia poziomu cytokin w surowicy wykonano metodą cytometrii przepływowej z użyciem zestawu BD Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson, USA). Ocenie podlegały cytokiny IL-17A, TNF, IL-10, IL-6, IL-2. Test wykonano zgodnie z zaleceniami producenta.

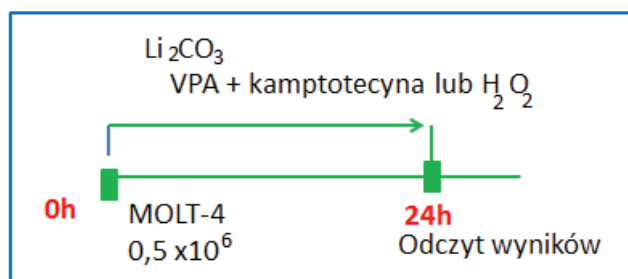
3.4. Indukcja apoptozy i jej modulacja przy pomocy badanych leków w linii komórkowej MOLT-4

W celu oceny na ile obserwowany efekt działania węglanu litu i VPA na limfocyty T ma charakter uniwersalny wykonano badania na linii komórkowej MOLT-4. Linia ta jest ludzką linią limfoblastyczną T, która została wyprowadzona z hodowli komórek pobranych od 19 letniego pacjenta z ostrą białaczką limfoblastyczną. Linia ta jest uważana za model limfocytów i posłużyła jako wzór możliwego zachowania się prawidłowych komórek układu immunologicznego w obecności badanych leków. Linia ta została zakupiona w firmie CLS Cell Line Servis GmbH (Niemcy) posiadającej certyfikat ISO9001:2008.

Komórki MOLT-4 były hodowane w kompletnym środowisku hodowlanym rekomendowanym przez ich dostawcę, złożonym z medium RPMI 1640 z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej, 2 mM L-glutaminy oraz antybiotyków: penicyliny w stężeniu 10 U/ml i streptomycyny w stężeniu 10 µg/ml w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i w 100% wilgotności.

Komórki zawieszane były w stężeniu 5x10⁵/ml w medium hodowlanym pełnym na płytce 24-dołkowej. Następnie komórki inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i w 100% wilgotności przez 24 godziny w obecności badanych leków oraz czynników wywołujących apoptozę według schematu zastosowanego dla PBMC (Ryciny 4, 5, 6). Po tym czasie była wykonana ocena apoptozy poprzez oznaczanie komórek barwnikiem JC-1 lub aneksyną V.

Schemat doświadczenia przedstawiono na Rycinie 19.



Rycina 19. Schemat doświadczenia badającego proces apoptozy linii komórkowej MOLT-4.

3.5. Analiza wyników cytometrycznych

Analiza fenotypu limfocytów oraz wyników proliferacji została wykonana programem FlowJo X 10.0.7 (Tree Star; USA). Dalsze opracowanie parametrów proliferacji komórek w obecności leków lub bez odbyła się przy użyciu programu PROGENY autorstwa prof. dr hab. med. Jacka Witkowskiego [87].

Analiza wyników apoptozy ocenianej zarówno metodą barwienia JC-1 jak i barwienia aneksyną była dokonana przy użyciu programu Cyflogic wersja 1.2.1 (© Perttu Terho & © CyFlo Ltd; Finland 2008).

3.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica wersja 10 (StatSoft, Inc., USA). Założenia o normalności rozkładu sprawdzano przy pomocy testów: Kołmogorowa-Smirnova z poprawką Lillieforsa i Shapiro-Wilka.

Ponieważ wyniki nie spełniały założeń rozkładu normalnego użyto testów nieparametrycznych – test kolejności par Wilcoxona. Znamienność statystyczna była oznaczana jako wartość p ; za różnice znamienne przyjmowano $p < 0,05$.

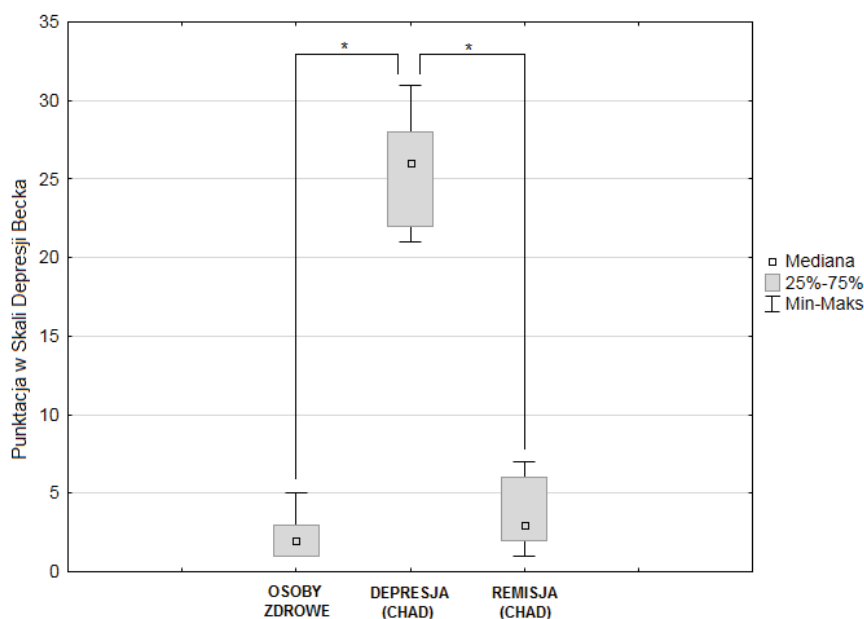
4. WYNIKI BADAŃ

4.1. Ocena stanu psychicznego z wykorzystaniem Skali Depresji Becka, Skali Depresji Hamiltona oraz Skali Manii Younga.

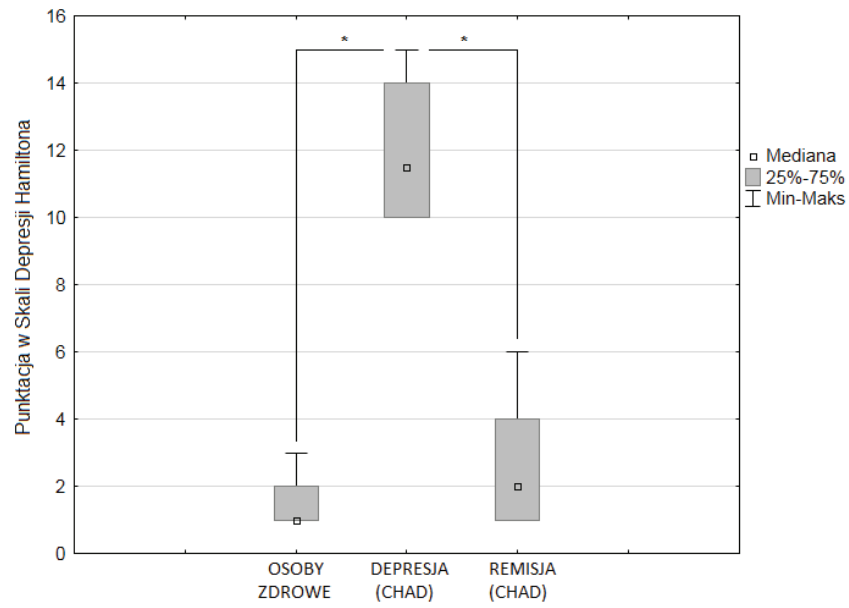
Ocena ogólnego stanu zdrowia oraz stanu psychicznego była dokonana przez lekarza psychiatrę. Przeprowadzono wywiad kliniczny zgodny z formularzem SCID. Objawy depresyjne były oceniane z wykorzystaniem Skali Depresji Becka oraz Skali Depresji Hamiltona natomiast objawy hipomaniakalne/maniakalne oceniano według punktacji w Skali Manii Younga.

Pacjenci zakwalifikowani do badań byli w stanie fizycznym dobrym. Nie stwierdzono u nich cukrzycy, hiperlipidemii, alergii, choroby niedokrwiennej serca, nadciśnienia, chorób o podłożu immunologicznym. Jedynymi lekami przyjmowanymi były węglan litu lub kwas walproinowy.

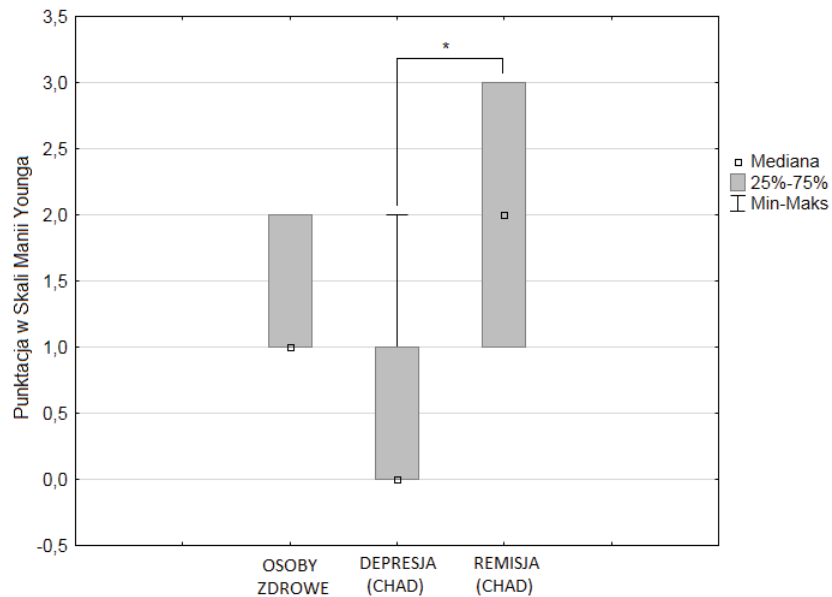
O dobrze dobranej grupie pacjentów oraz zdrowej kontroli świadczą wyniki uzyskane przez poszczególne grupy badane, zarówno w Skali Depresji Becka (Rycina 20) oraz Hamiltona (Rycina 21) jak i Skali Manii Younga (Rycina 22). Pacjenci zostali podzieleni po wywiadzie psychiatrycznym na dwie grupy: osoby w depresji w przebiegu CHAD oraz osoby w remisji. Różnica pomiędzy tymi dwoma grupami była istotna statystycznie – osoby depresyjne wykazywały zdecydowanie wyższą punktację niż grupa w remisji oraz osoby zdrowe. Potwierdził to zarówno Test Becka jak i skala Depresji Hamiltona. Pomiędzy pacjentami w remisji a zdrową kontrolą nie było różnic w wynikach testu.



Rycina 20. Wyniki Skali Depresji Becka ($n_{zdrowi}=20$, $n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$; norma: 0-10pkt).



Rycina 21. Wyniki Skali Depresji Hamiltona ($n_{zdrowi}=20$, $n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$; norma: 0-7pkt).



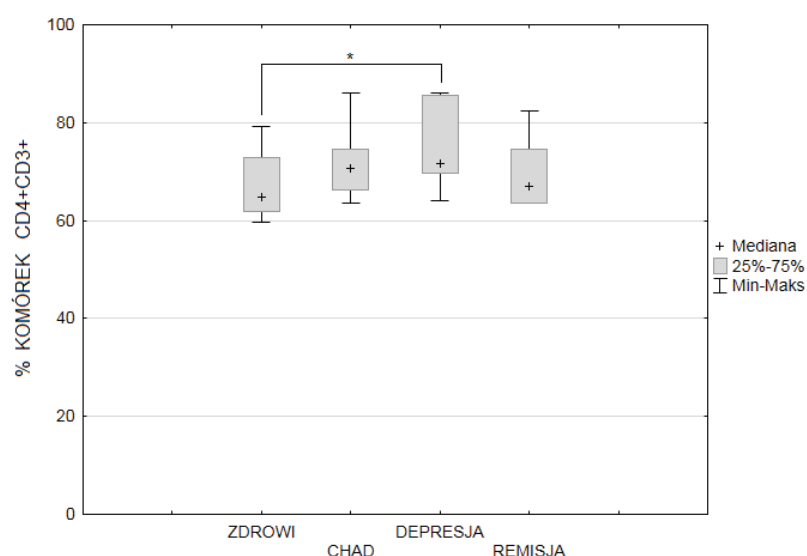
Rycina 22. Wyniki Skali Manii Younga ($n_{zdrowi}=20$, $n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$; norma: 0-20pkt).

W Skali Manii Younga istnieje wyraźna różnica pomiędzy pacjentami w depresji a w remisji choroby, pomimo iż wyniki osób w remisji mieściły się w zakresie normy tego testu. Różnica ta jest istotna statystycznie. Na rycinie 22 zależność ta jest pokazana również w odniesieniu do punktacji uzyskanej przez zdrową kontrolę, która przyjmuje wartości pośrednie pomiędzy wynikami uzyskanymi przez osoby w depresji i osoby w remisji.

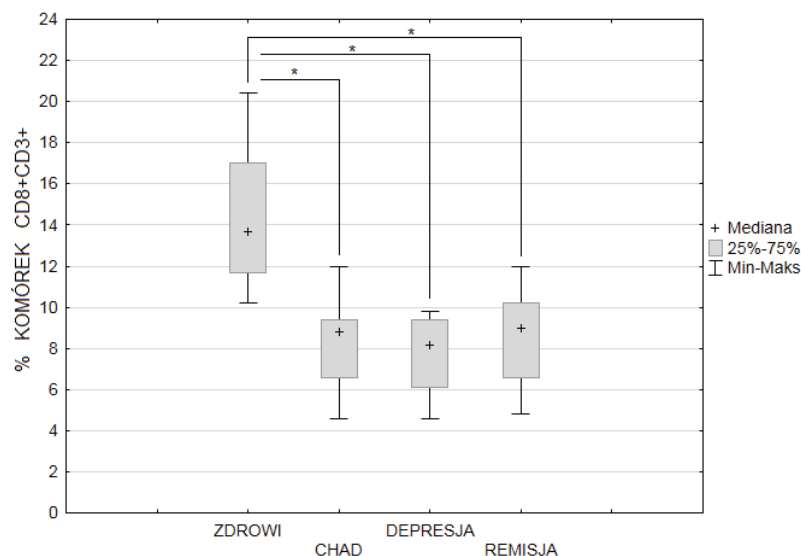
4.2. Ocena fenotypu limfocytów krwi obwodowej *ex vivo*.

Ex vivo badano odsetki dwóch głównych populacji limfocytów, czyli komórki $CD3^+CD4^+$ (limfocyty pomocnicze T_h) oraz komórki $CD3^+CD8^+$ (limfocyty cytotoksyczne T_c). Oznaczano również odsetki komórek z uwzględnieniem wybranych markerów aktywacji: antygenów CD197 (CCR7), CD25 oraz CD154 (CD40L) w populacji komórek $CD4^+CD3^+$ oraz antygen CD154 w populacji komórek $CD3^+CD8^+$. Wyliczany był również indeks $CD4^+/CD8^+$ w populacji limfocytów T.

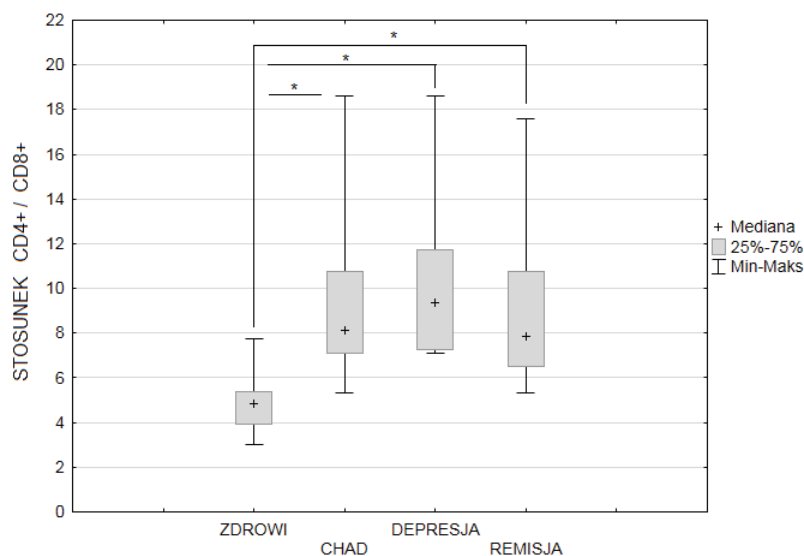
Zaobserwowano statystycznie znamienne wzrost odsetka komórek $CD3^+CD4^+$ u osób chorych na chorobę afektywną dwubiegunową będących w fazie depresyjnej w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 23). Z kolei odsetek komórek $CD3^+CD8^+$ ulegał znaczącemu obniżeniu u osób chorych zarówno w fazie depresyjnej, jak i w remisji w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej (Rycina 24). Indeks $CD4^+/CD8^+$ był znacząco wyższy u chorych z CHAD w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 25).



Rycina 23. Odsetek komórek $CD4^+CD3^+$ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$); test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



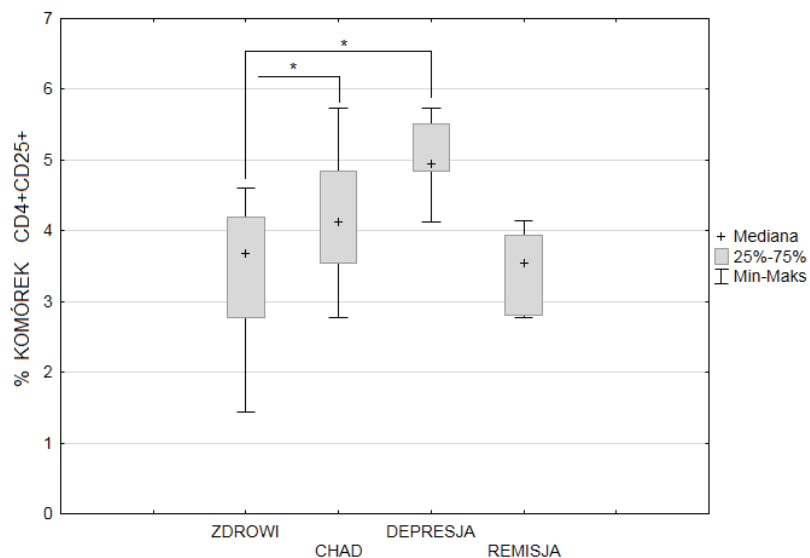
Rycina 24. Odsetek komórek $CD8^+CD3^+$ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$) ; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



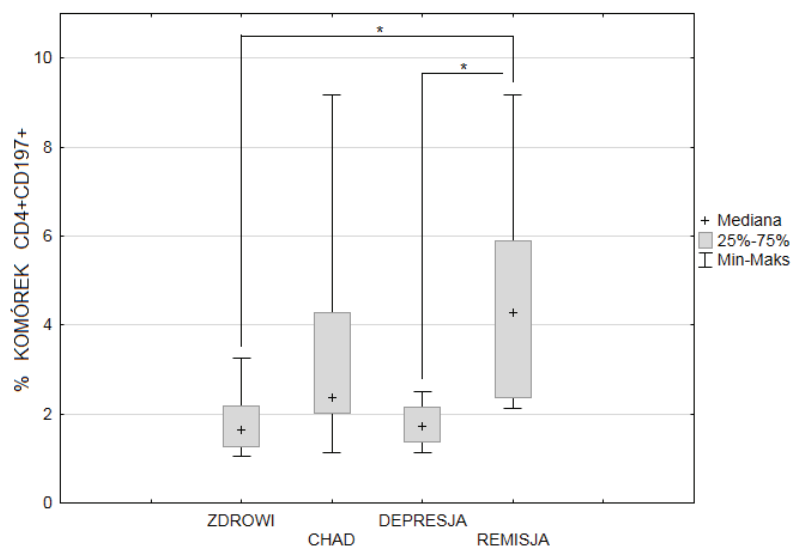
Rycina 25. Stosunek limfocytów $CD4^+$ do limfocytów $CD8^+$ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$) ; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

Odsetek komórek $CD25^+$ w populacji limfocytów $CD4^+$ był znacząco wyższy u osób chorych z CHAD, w szczególności w grupie chorych w fazie depresyjnej w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 26). Z kolei, chorzy w remisji charakteryzowali się wzrostem komórek $CD4^+CD197^+$ w porównaniu z osobami zdrowymi oraz chorymi w fazie depresyjnej (Rycina 27). Również w tej grupie chorych obserwowano wzrost odsetka komórek $CD154^+$ zarówno w populacji limfocytów $CD4^+$

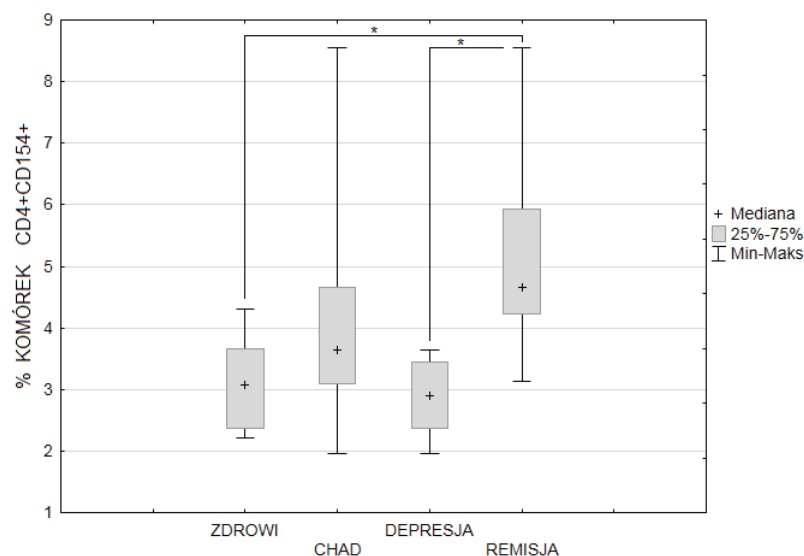
(Rycina 28) jak też limfocytów $CD8^+$ (Rycina 29) w porównaniu ze zdrowymi oraz z chorymi w fazie depresyjnej.



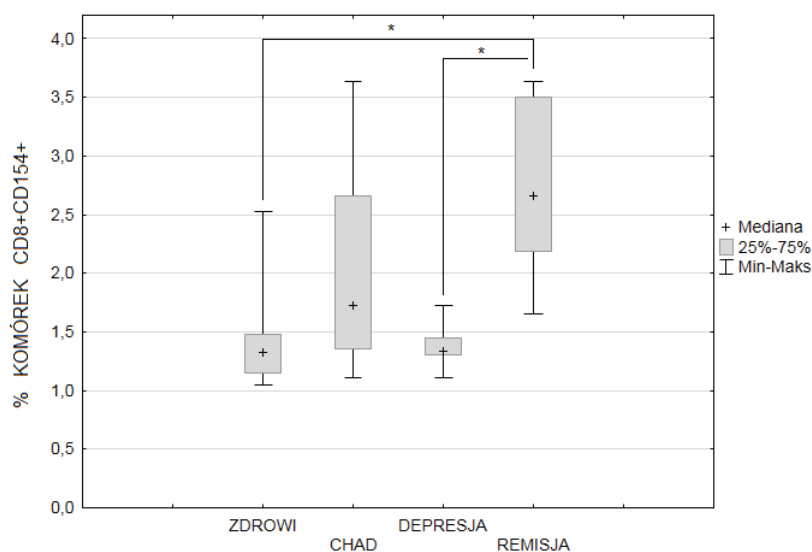
Rycina 26. Odsetek komórek $CD25^+$ w populacji limfocytów $CD4^+$ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$); test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



Rycina 27. Odsetek komórek $CD197^+$ w populacji limfocytów $CD4^+$ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$); test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



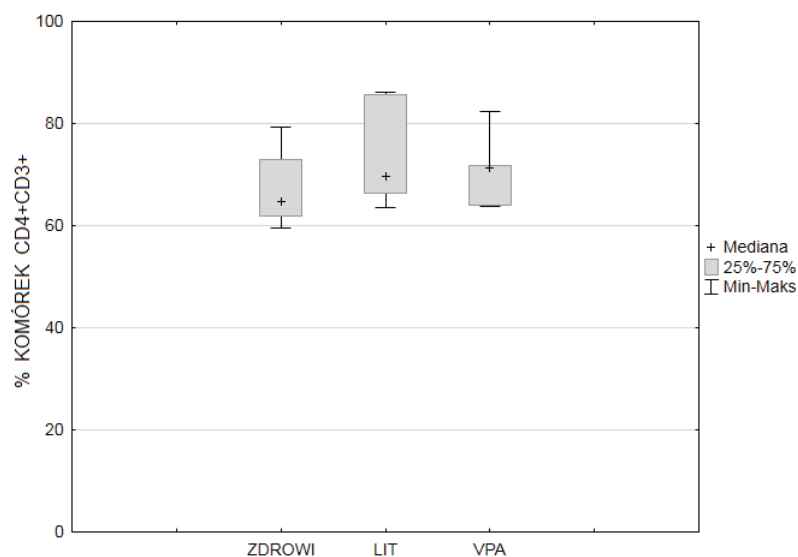
Rycina 28. Odsetek komórek CD154⁺ w populacji limfocytów CD4⁺ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$); test kolejności par Wilcozona, * $p<0,05$.



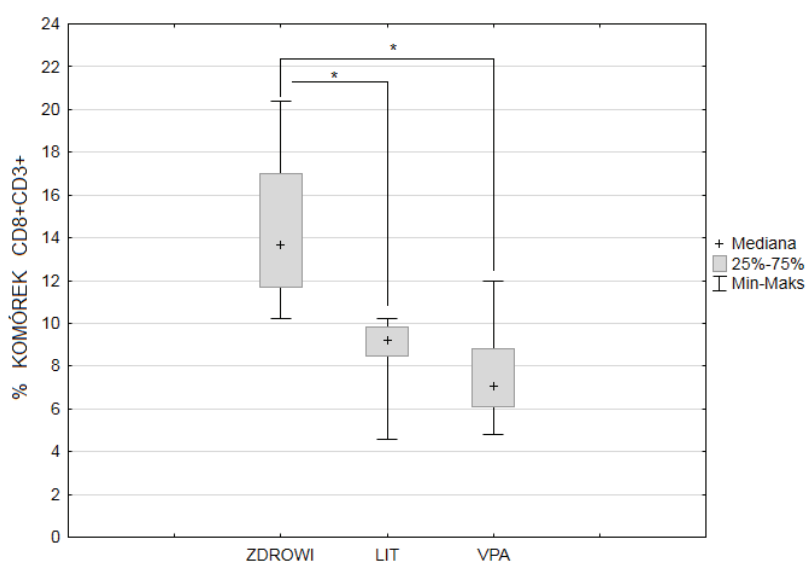
Rycina 29. Odsetek komórek CD154⁺ w populacji limfocytów CD8⁺ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$); test kolejności par Wilcozona, * $p<0,05$.

Wymienione wyżej parametry limfocytów zanalizowano również w zależności od leku, jaki otrzymywali pacjenci. Nie stwierdzono różnic w odsetku limfocytów CD4⁺CD3⁺ pomiędzy grupą kontrolną a pacjentami leczonymi węglanem litu lub kwasem walproinowym (Rycina 30). Natomiast

odsetek komórek $CD8^+CD3^+$ był zmiennie niższy zarówno u chorych leczonych węglanem litu, jak i kwasem walproinowym w porównaniu ze zdrową kontrolą (Rycina 31). Konsekwentnie, chorzy z CHAD zażywający oba leki charakteryzują się wyższym stosunkiem limfocytów $CD4^+$ do limfocytów $CD8^+$ niż osoby zdrowe (Rycina 32).

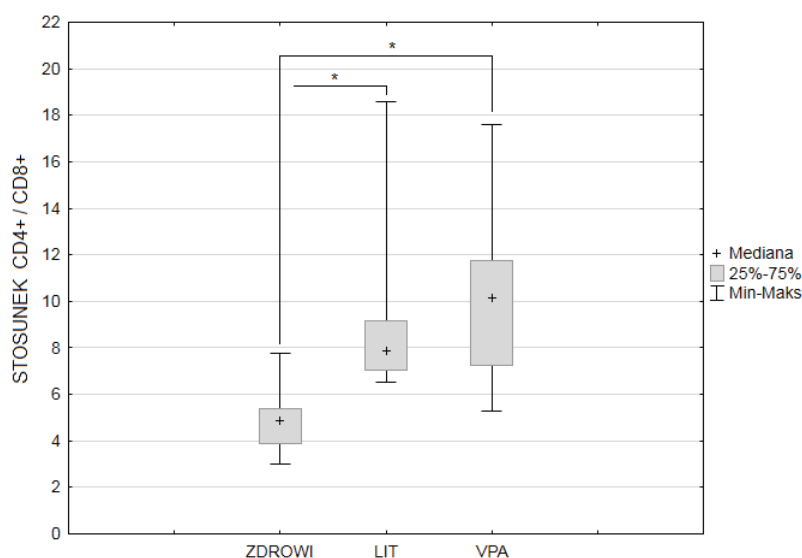


Rycina 30. Odsetek komórek $CD4^+CD3^+$ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{lit}=7$, $n_{VPA} = 6$); test kolejności par Wilcoxona.

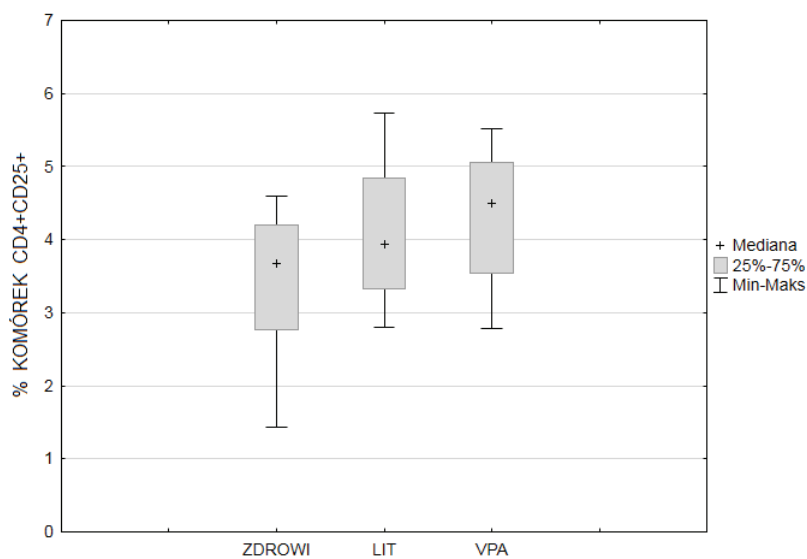


Rycina 31. Odsetek komórek $CD8^+CD3^+$ w grupie osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{lit}=7$, $n_{VPA} = 6$); test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

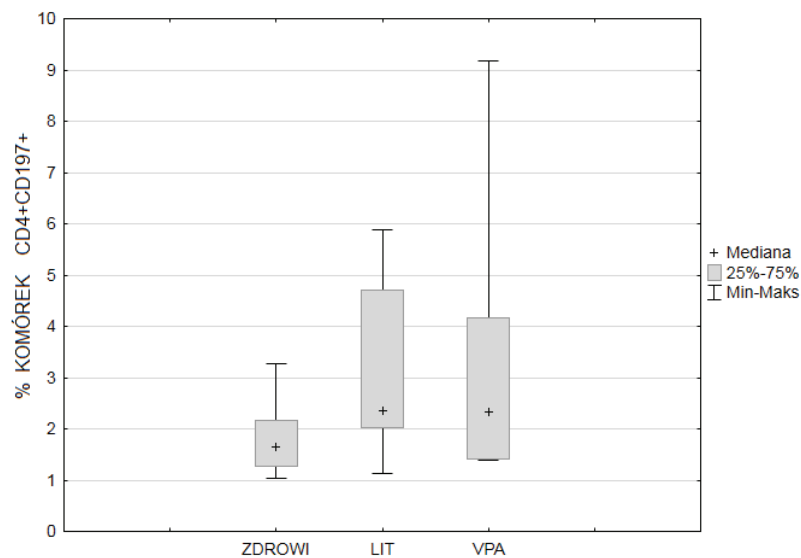
Stosowane u chorych na CHAD leki nie wpływały też na odsetek komórek CD25⁺, CD197⁺ oraz CD154⁺ w populacji limfocytów CD4⁺ (Ryciny 33, 34, 35, odpowiednio). Pacjenci leczeni węglanem litu oraz kwasem walproinowym charakteryzowali się natomiast wzrostem odsetka komórek CD154⁺CD8⁺ w porównaniu do osób zdrowych – nie jest to jednak zależność istotna statystycznie (Rycina 36).



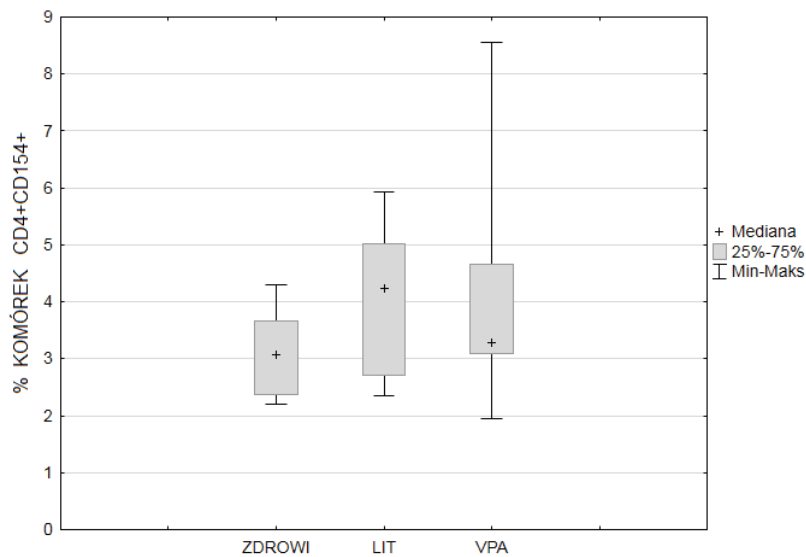
Rycina 32. Stosunek limfocytów CD4⁺ do CD8⁺ w grupie osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{\text{lit}}=7$, $n_{\text{VPA}} = 6$); test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



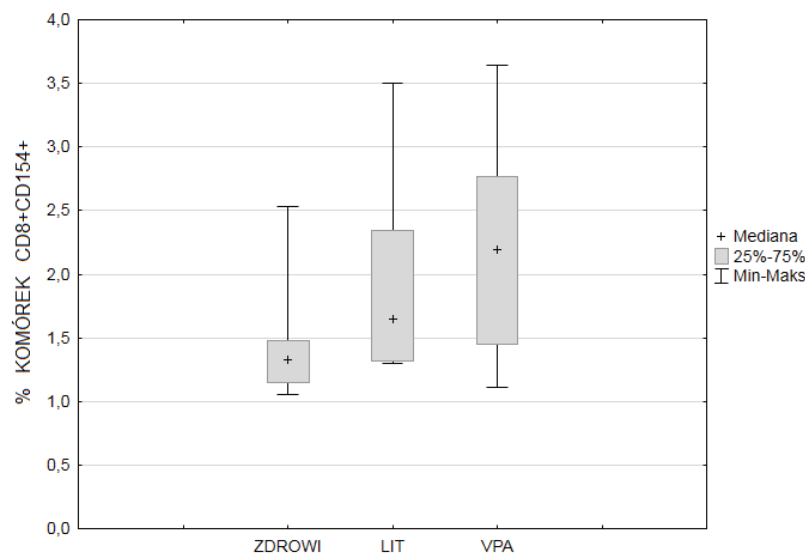
Rycina 33. Odsetek komórek CD25⁺ w populacji limfocytów CD4⁺ w grupie osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{\text{lit}}=7$, $n_{\text{VPA}} = 6$); test kolejności par Wilcoxona.



Rycina 34. Odsetek komórek CD197⁺ w populacji limfocytów CD4⁺ w grupie osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{\text{lit}}=7$, $n_{\text{VPA}}=6$); test kolejności par Wilcoxon.



Rycina 35. Odsetek komórek CD154⁺ w populacji limfocytów CD4⁺ w grupie osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{\text{lit}}=7$, $n_{\text{VPA}}=6$); test kolejności par Wilcoxon.



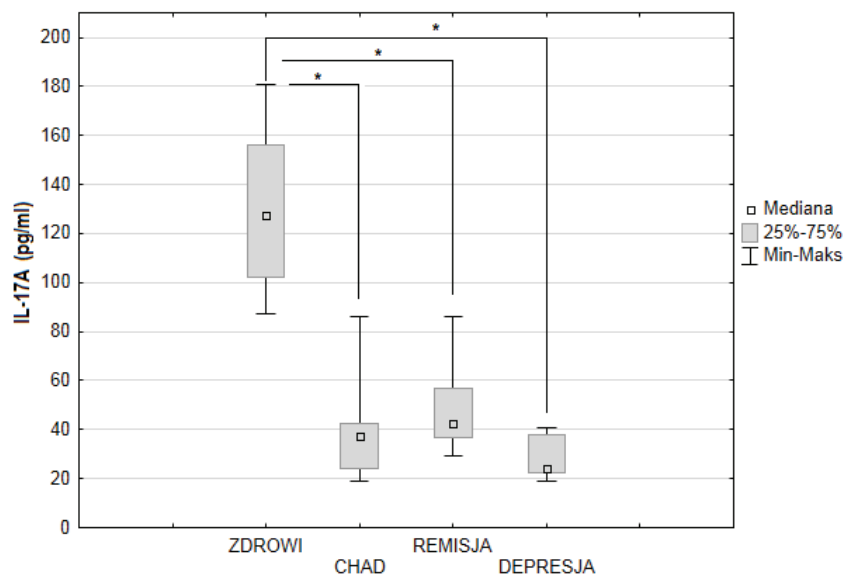
Rycina 36. Odsetek komórek CD154⁺ w populacji limfocytów CD8⁺ w grupie osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{\text{lit}}=7$, $n_{\text{VPA}}=6$); test kolejności par Wilcoxon.

4.3. Ocena poziomu cytokin w surowicy krwi.

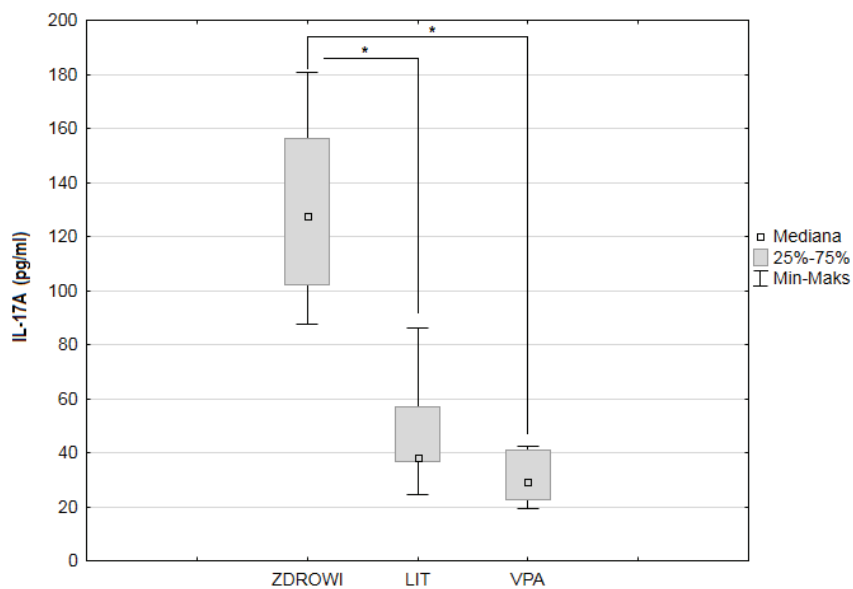
Poziom cytokin (IL-17A, TNF, IL-10 oraz IL-6) oznaczano w surowicy krwi osób zdrowych oraz pacjentów z CHAD.

Poziom **IL-17A** był znacząco niższy u osób chorych na CHAD w obydwu fazach choroby w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 37). Biorąc jednak pod uwagę przyjmowane leki przez pacjentów, chorzy przyjmujący związki litu charakteryzują się nieznacznie wyższym poziomem IL-17A w surowicy krwi w porównaniu do chorych przyjmujących kwas walproinowy (Rycina 38).

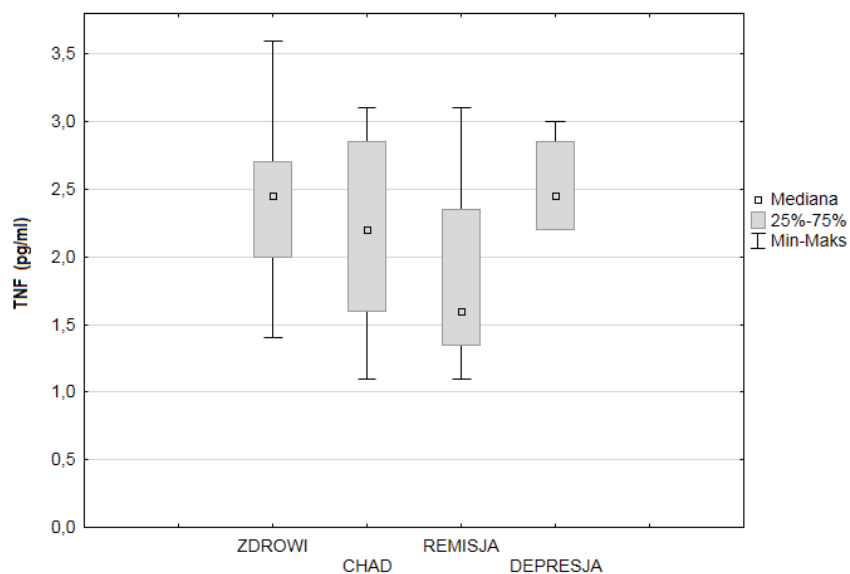
Nie wykazano różnic w poziomie **TNF-α** pomiędzy badanymi grupami; chorzy charakteryzują się niższym stężeniem TNF-α ale nie jest to zależność istotna statystycznie (Rycina 39). Stosowane leki też nie wpływały na poziom tej cytokiny u chorych (Rycina 40).



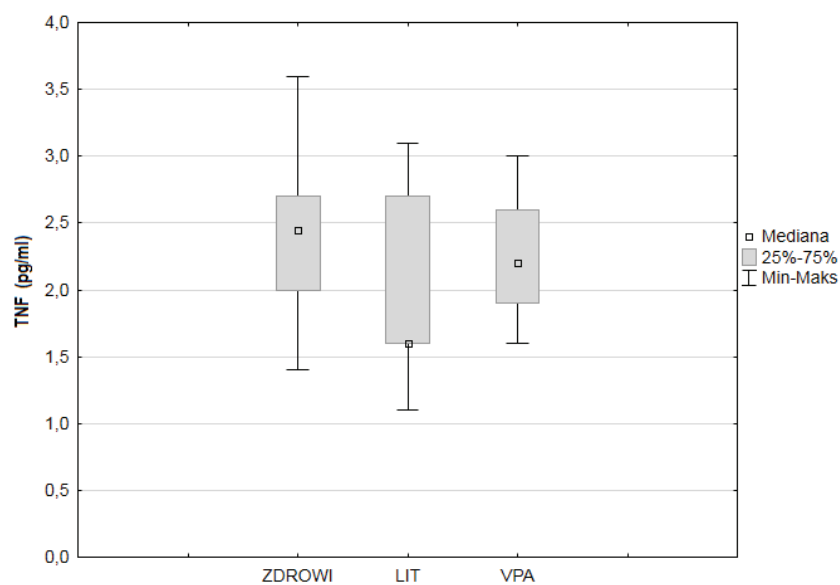
Rycina 37. Poziom cytokiny IL-17A w surowicy u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$) ; test kolejności par Wilcoxon.



Rycina 38. Poziom cytokiny IL-17A w surowicy u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{lit}=7$, $n_{VPA}=6$); test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



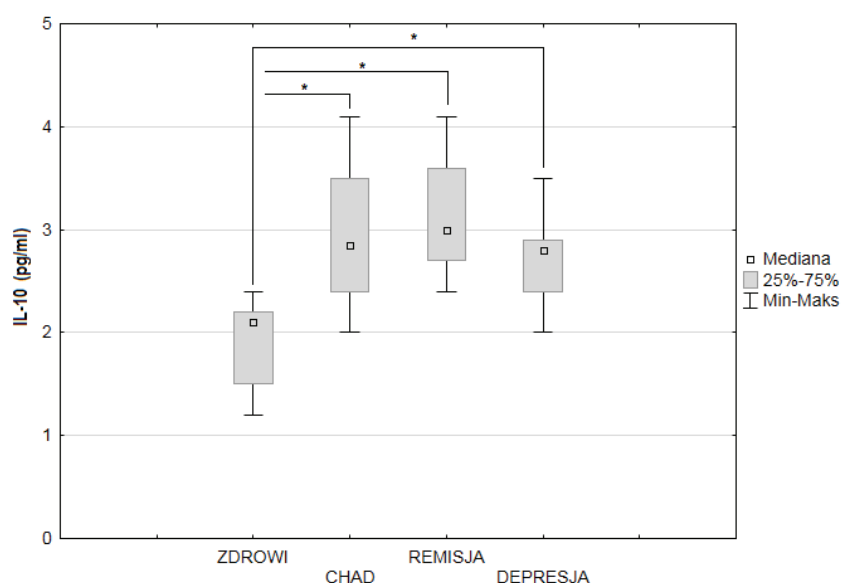
Rycina 39. Poziom TNF- α w surowicy u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{\text{remisja}}=7$, $n_{\text{depresja}}=6$) ; test kolejności par Wilcoxona.



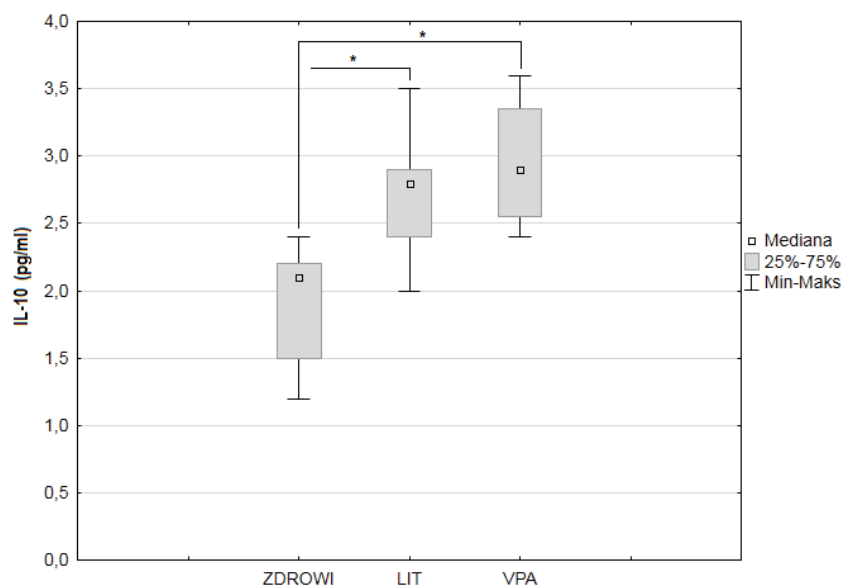
Rycina 40. Poziom TNF- α w surowicy u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{\text{lir}}=7$, $n_{\text{VPA}}=6$); test kolejności par Wilcoxona.

Poziom **IL-10** był zmiennie wyższy u chorych z CHAD, zarówno w fazie depresyjnej jak i w remisji w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej (Rycina 41). Nie wykazano różnic w stężeniu IL-10 w zależności od fazy choroby. Zarówno pacjenci leczeni węglanem litu jak i ci leczeni kwasem walproinowym charakteryzowali się wyższym poziomem IL-10 w stosunku do osób zdrowych (Rycina 42).

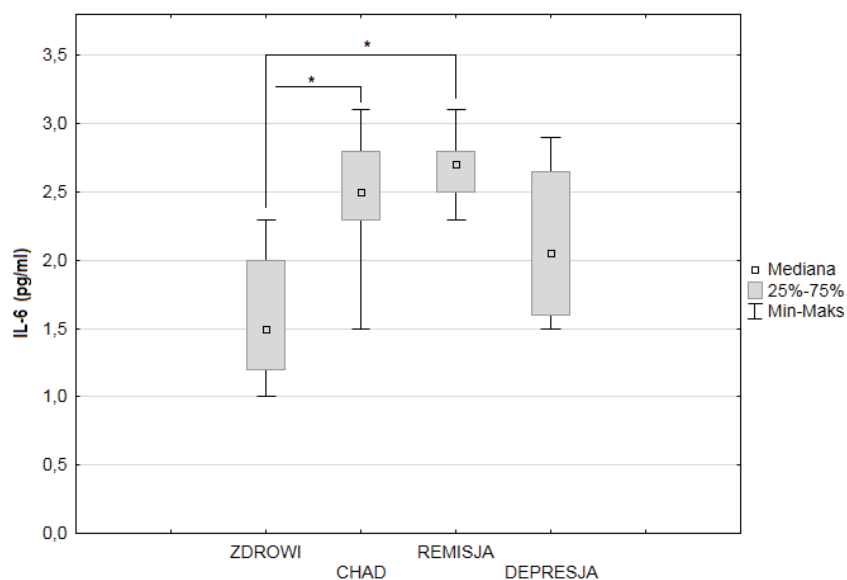
Poziom **IL-6** był zmiennie wyższy u chorych z CHAD, w szczególności pacjentów w fazie remisji w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 43). Pacjenci leczeni węglanem litu charakteryzowali się natomiast wzrostem stężenia IL-6 w porównaniu do osób zdrowych oraz chorych leczonych kwasem walproinowym (Rycina 44).



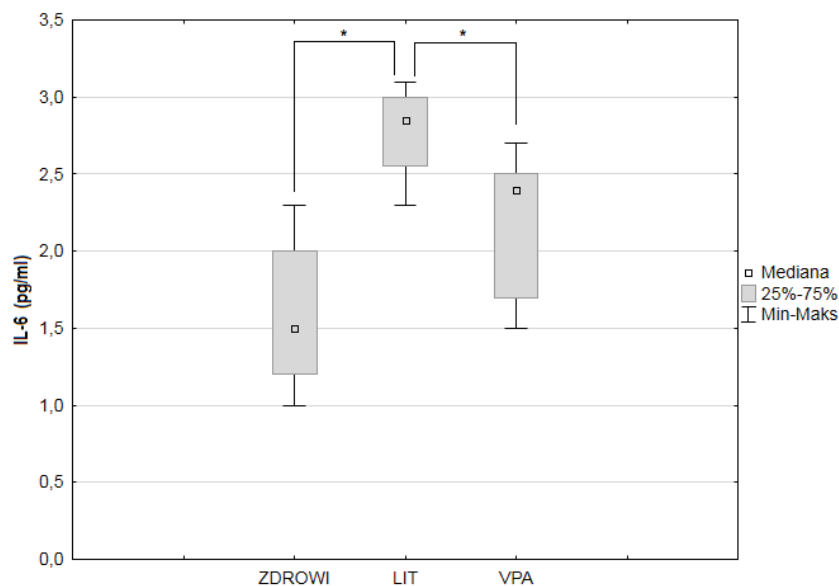
Rycina 41. Poziom IL-10 w surowicy u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$) ; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



Rycina 42. Poziom cytokiny IL-10 w surowicy u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{lit}=7$, $n_{VPA}=6$); test kolejności par Wilcoxona, * $p<0.05$.



Rycina 43. Poziom IL-6 w surowicy u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD ($n_{remisja}=7$, $n_{depresja}=6$); test kolejności par Wilcoxona, * $p<0.05$.

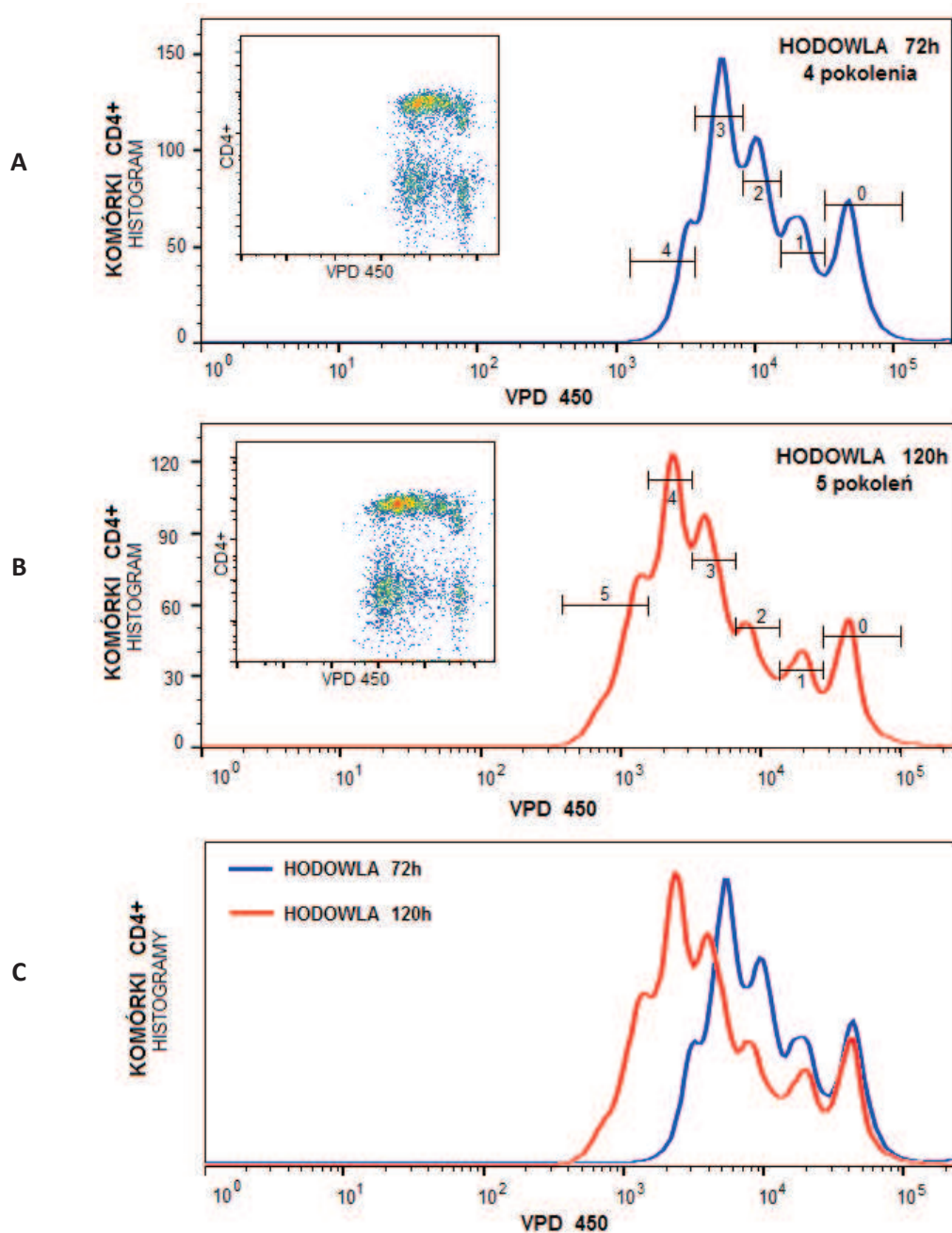


Rycina 44. Poziom cytokiny IL-6 w surowicy u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=20$) oraz pacjentów chorych na CHAD leczonych węglanem litu lub kwasem walproinowym ($n_{\text{lit}}=7$, $n_{\text{VPA}}=6$); test kolejności par Wilcoxona, * $p<0.05$.

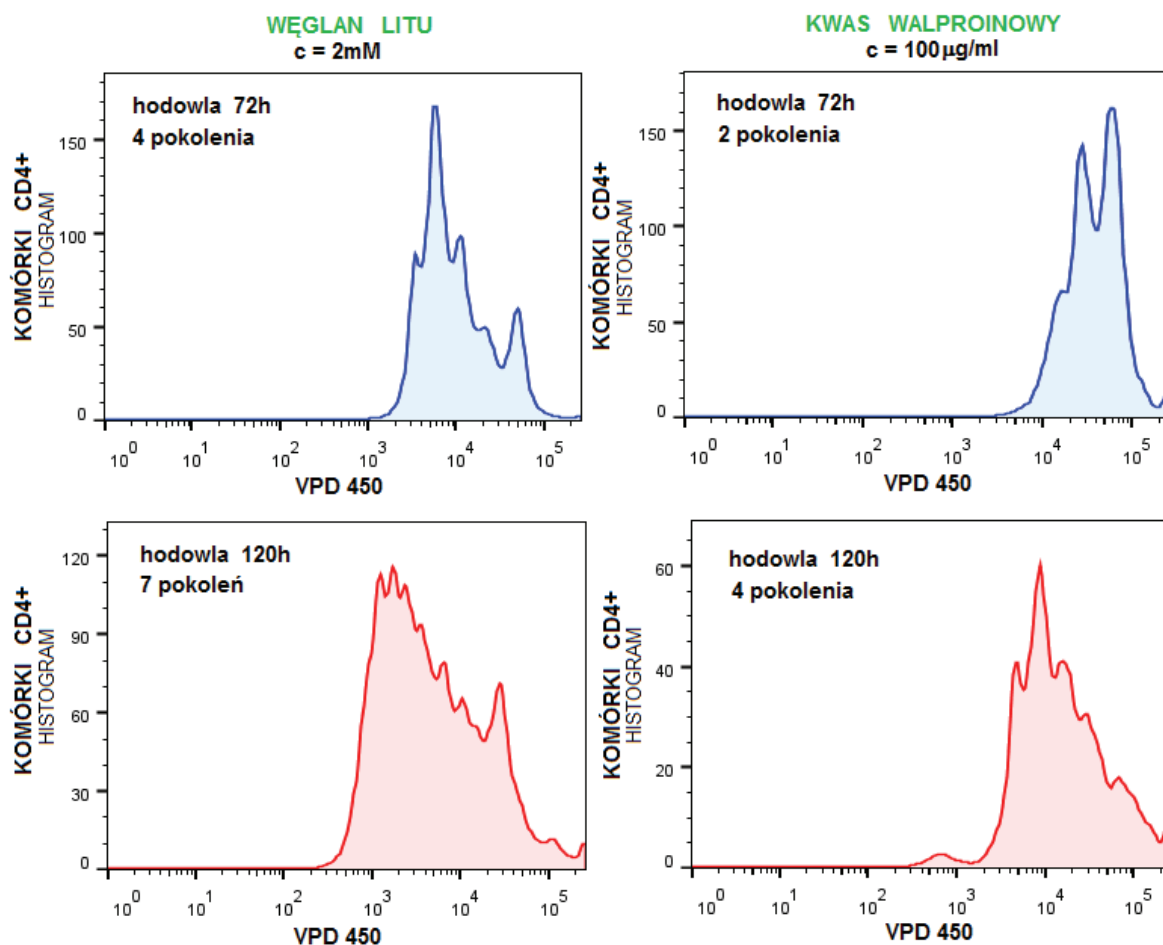
4.4. Ocena wpływu leków normotymicznych na proliferację limfocytów T.

Proliferację populacji limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$ oceniano z użyciem barwnika VPD 450 metodą DCT opisaną w Materiale i Metodach w rozdziale 3.3.5. Analiza plików cytometrycznych została dokonana przy użyciu programu FlowJo natomiast wyliczenia poszczególnych parametrów proliferacji zostały dokonane programem PROGENY (rozdział 3.5).

Rycina 45 przedstawia przykładowe wykresy pokazujące liczby podziałów limfocytów $CD4^+$ po 72 (4 podziały) i 120 godzinach (5 podziałów) stymulacji konkanawaliną A. Natomiast rycina 46 pokazuje przykładowe histogramy przedstawiające wpływ leków normotymicznych na proliferację tych komórek. Węglan litu w stężeniu 2 mM powoduje zwiększenie liczby podziałów po 120 godzinach z 5 do 7. Natomiast kwas walproinowy w stężeniu $100\mu\text{g/ml}$ powoduje zmniejszenie liczby podziałów do 2 w 72 i 4 w 120 godzinie hodowli komórkowej.



Rycina 45. Ocena proliferacji limfocytów CD4⁺ metodą DCT. Histogramy oraz dot-ploty obrazują ilość podziałów badanej populacji po stymulacji konkanawaliną A po hodowli 72 (A) i 120 (B) godzinach. Rycina C porównuje ilość podziałów po 72 i 120 godzinach (nałożone histogramy A i B).



Rycina 46. Ocena wpływu leków normotymicznych na proliferację limfocytów CD4^+ . Wykresy przedstawiają przykładowe histogramy prezentujące ilość podziałów badanej populacji po stymulacji konkanawaliną A przez 72 i 120 godziny w obecności węglanu lity w stężeniu 2 mM lub kwasu walproinowego w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$.

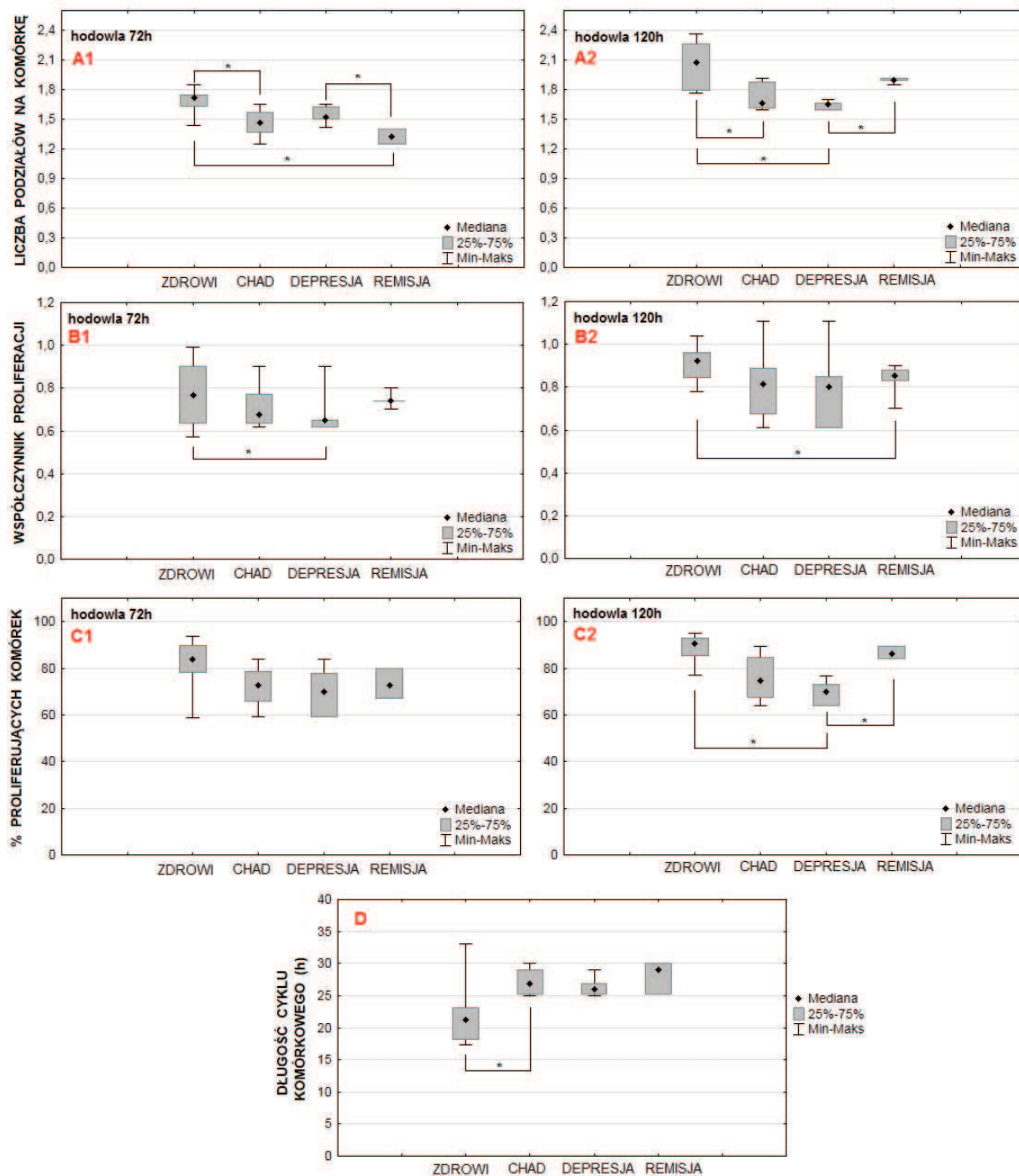
4.4.1. Porównanie parametrów proliferacji limfocytów T pomiędzy osobami zdrowymi i chorymi na CHAD.

Zastosowanie metody DCT pozwoliło na obliczenie oraz porównanie w badanych grupach następujących parametrów proliferacyjnych stymulowanych konkanawaliną A limfocytów T CD4^+ lub CD8^+ : liczbę podziałów przypadających na jedną komórkę, współczynnik proliferacji, odsetek komórek dzielących się oraz długość cyklu komórkowego.

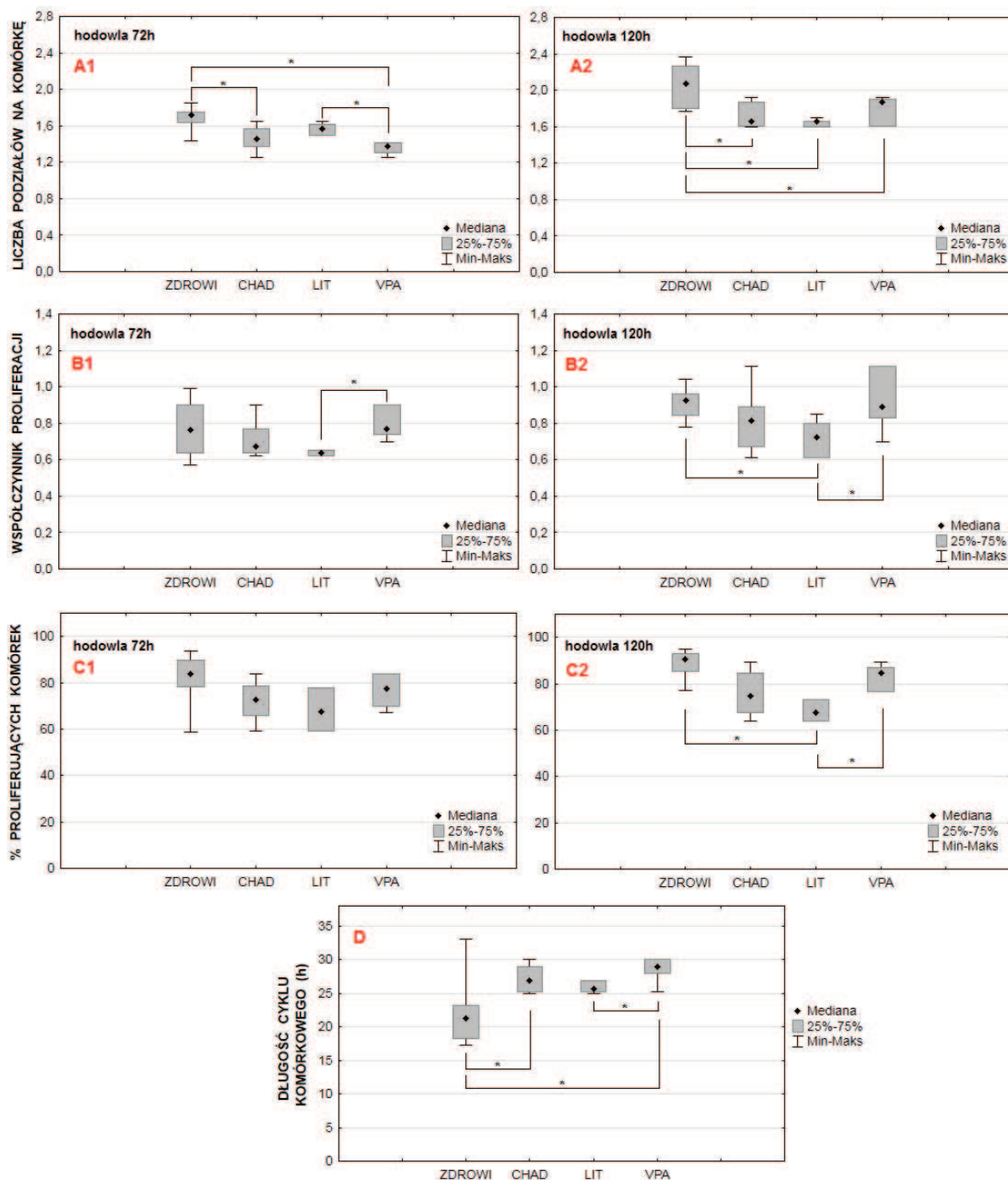
Na początku porównywano parametry proliferacyjne limfocytów CD4^+ w zależności od fazy choroby. I tak, **liczba podziałów na komórkę** w przypadku populacji limfocytów CD4^+ chorych z CHAD była istotnie niższa niż u osób zdrowych, zarówno w hodowli trwającej 72 godziny jak i 120 godzin

(Rycina 47 A1 i A2). Przy czym, po 72 godzinach stymulacji spadek w liczbie podziałów dotyczył przede wszystkim chorych znajdujących się w fazie remisji, podczas gdy po 120 godzinach różnica ta dotyczyła chorych w depresji. **Współczynnik proliferacji** limfocytów CD4⁺ chorych na CHAD w fazie depresji był zmiennie niższy w porównaniu do osób zdrowych po 72 godzinach stymulacji; po 120 godzinach spadek ten się utrzymywał, choć nie był zmienny (Rycina 47 B1 i B2). Po 120 godzinach spadek współczynnika proliferacji był istotnie obniżony u pacjentów w fazie remisji (Rycina 47 B2). **Odsetek proliferujących komórek** CD4⁺ był zmiennie obniżony u chorych w fazie depresji w porównaniu do osób zdrowych i pacjentów znajdujących się w fazie remisji (Rycina 47 C2). Natomiast **długość cyklu komórkowego** była zmiennie wyższa u chorych z CHAD w porównaniu do osób zdrowych; dotyczyło to zarówno osób w fazie depresji jak i remisji, choć różnice te nie były statystycznie istotne (Rycina 47 D).

Następnie porównano te same parametry w zależności od stosowanego leku. Liczba podziałów na komórkę limfocytów CD4⁺ był zmiennie niższa zarówno u chorych leczonych węglanem litu jak kwasem walproinowym, co było szczególnie widoczne po 120 godzinach stymulacji konkanawaliną A (Rycina 48 A1 i A2). Współczynnik proliferacji tej populacji był zmiennie niższy u chorych przyjmujących lit w porównaniu do osób leczonych kwasem walproinowym po 72 godzinach (Rycina 48 B1) a także do osób zdrowych po 120 godzinach stymulacji (Rycina 48 B2). Odsetek proliferujących komórek CD4⁺ był zmiennie obniżony u chorych leczonych węglanem litu w porównaniu do osób zdrowych i pacjentów leczonych kwasem walproinowym (Rycina 48 C2). W obu grupach chorych limfocyty CD4⁺ charakteryzowały się zmiennie dłuższym cyklem komórkowym w porównaniu do osób zdrowych; przy czym był on też dłuższy u chorych leczonych kwasem walproinowym w porównaniu do pacjentów leczonych litem (Rycina 48 D).



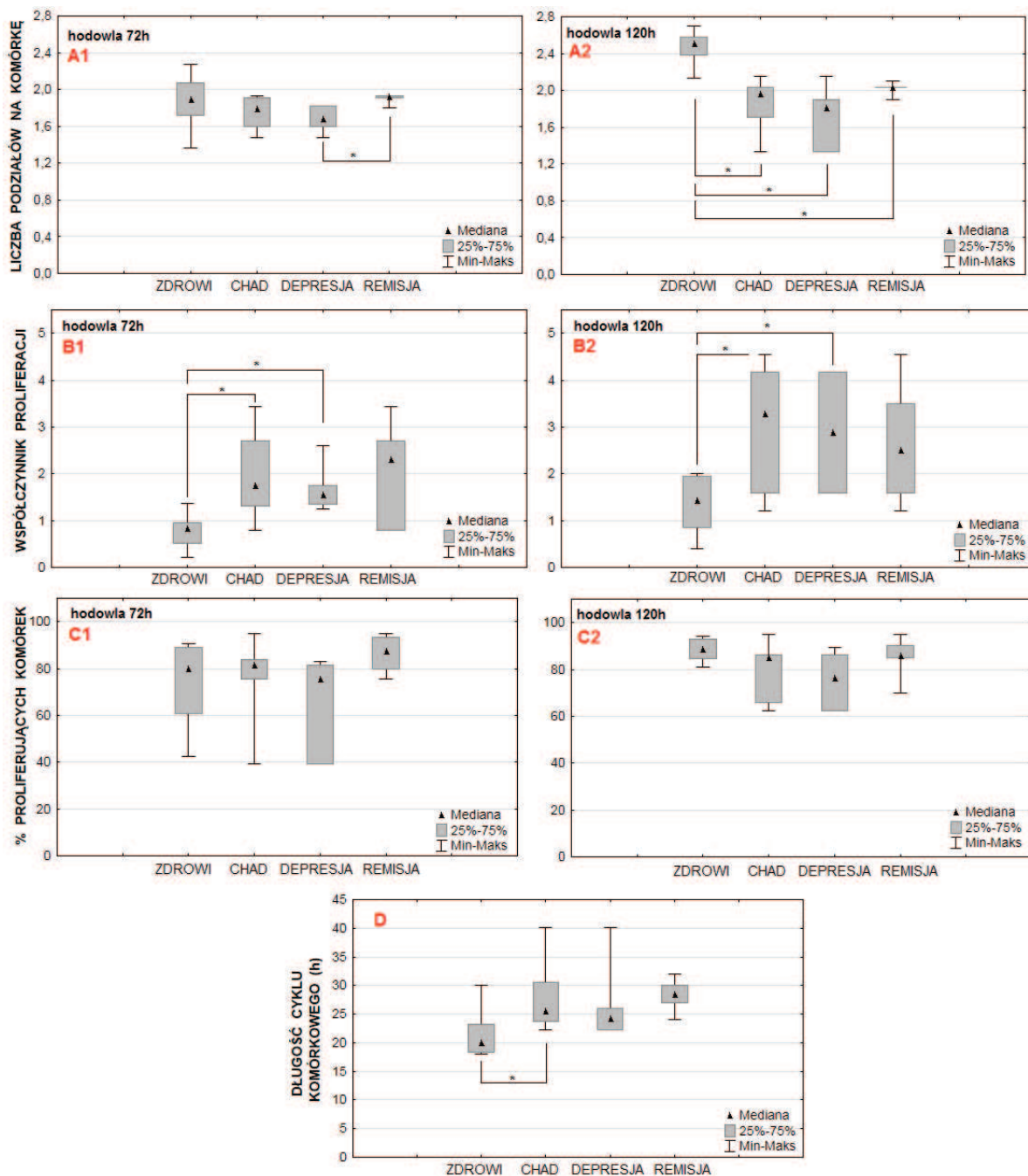
Rycina 47. Parametry proliferacji limfocytów T CD4⁺ u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$), oraz chorych na CHAD ($n=9$): w fazie depresji ($n_{\text{depresja}}=5$) lub w fazie remisji ($n_{\text{remisja}}=4$). Wykresy przedstawiają: liczbę podziałów na komórkę po 72 godzinach (A1), liczbę podziałów na komórkę po 120 godzinach (A2); współczynnik proliferacji po 72 godzinach (B1), współczynnik proliferacji po 120 godzinach (B2); procent proliferujących po 72 godzinach (C1), procent proliferujących po 120 godzinach (C2), długość cyklu komórkowego (D); test kolejności par Wilcoxona; * $p < 0,05$.



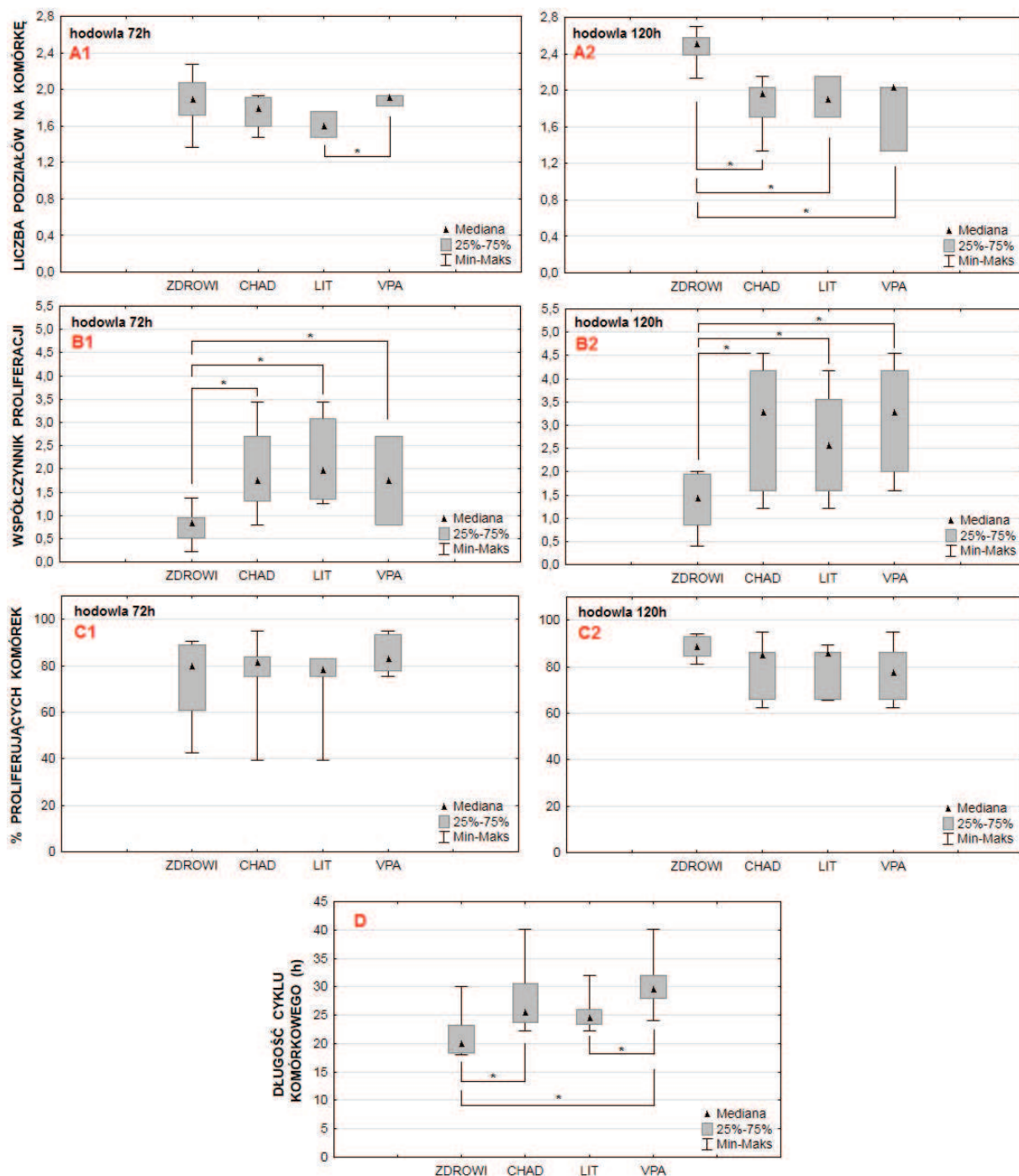
Rycina 48. Parametry proliferacji limfocytów T $CD4^+$ u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=5$), oraz chorych na CHAD ($n=9$): przyjmujących węglan litu ($n_{lit}=5$) lub kwas walproinowy ($n_{VPA}=4$). Wykresy przedstawiają: liczbę podziałów na komórkę po 72 godzinach (A1), liczbę podziałów na komórkę po 120 godzinach (A2); współczynnik proliferacji po 72 godzinach (B1), współczynnik proliferacji po 120 godzinach (B2), procent proliferujących po 72 godzinach (C1), procent proliferujących po 120 godzinach (C2), długość cyklu komórkowego (D); test kolejności par Wilcoxona; * $p < 0,05$.

Ten sam rodzaj analizy statystycznej wykonano dla populacji limfocytów CD8⁺. Najpierw więc porównano parametry proliferacyjne tych komórek w zależności od fazy choroby. Liczba podziałów na komórkę w tej populacji była istotnie niższa u chorych z CHAD znajdujących się w fazie depresji w porównaniu do chorych w fazie depresji po 72 godzinach (Rycina 49 A1); po 120 godzinach obie grupy chorych charakteryzowały się niższą liczbą podziałów w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 49 A2). Z kolei, współczynnik proliferacji limfocytów CD8⁺ chorych na CHAD, zwłaszcza pacjentów w fazie depresji był znamienne wyższy niż w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 49 B1 i B2). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w odsetku proliferujących komórek pomiędzy badanymi grupami (Rycina 49 C1 i C2). Natomiast długość cyklu komórkowego, podobnie jak w przypadku populacji komórek CD4⁺, była znamienne wyższa u chorych z CHAD w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 49 D).

Następnie porównano te same parametry w zależności od stosowanego leku. Liczba podziałów na komórkę limfocytów CD8⁺ była znamienne niższa zarówno u chorych leczonych węglanem litu jak kwasem walproinowym po 120 godzinach stymulacji konkanawaliną A (Rycina 50 A2). Współczynnik proliferacji tej populacji był znamienne wyższy u wszystkich chorych w porównaniu do osób zdrowych bez względu na rodzaj stosowanego leku (Rycina 50 B1 i B2). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w odsetku proliferujących komórek pomiędzy badanymi grupami (Rycina 50 C1 i C2). Limfocyty CD8⁺ chorych z CHAD leczonych kwasem walproinowym charakteryzowały się dłuższym cyklem komórkowym w porównaniu do osób zdrowych oraz pacjentów leczonych litem (Rycina 50 D).



Rycina 49. Parametry proliferacji limfocytów T $CD8^+$ u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=5$), oraz chorych na CHAD ($n=9$): w fazie depresji ($n_{depresja}=5$) lub w fazie remisji ($n_{remisja}=4$). Wykresy przedstawiają: liczbę podziałów na komórkę po 72 godzinach (A1), liczbę podziałów na komórkę po 120 godzinach (A2); współczynnik proliferacji po 72 godzinach (B1), współczynnik proliferacji po 120 godzinach (B2), procent proliferujących po 72 godzinach (C1), procent proliferujących po 120 godzinach (C2), długość cyklu komórkowego (D); test kolejności par Wilcoxona; * $p < 0,05$.

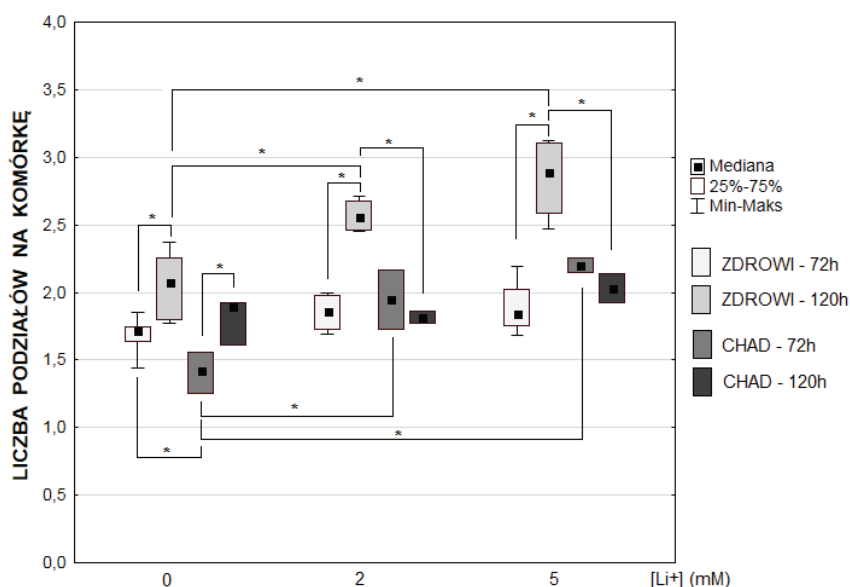


Rycina 50. Parametry proliferacji limfocytów T $CD8^+$ u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=5$), oraz chorych na CHAD ($n=9$): przyjmujących węglan litu ($n_{lit}=5$) lub kwas walproinowy ($n_{VPA}=4$). Wykresy przedstawiają: liczbę podziałów na komórkę po 72 godzinach (A1), liczbę podziałów na komórkę po 120 godzinach (A2); współczynnik proliferacji po 72 godzinach (B1), współczynnik proliferacji po 120 godzinach (B2), procent proliferujących po 72 godzinach (C1), procent proliferujących po 120 godzinach (C2), długość cyklu komórkowego (D); test kolejności par Wilcoxona; * $p < 0,05$.

4.4.2. Ocena wpływu leków normotymicznych na proliferację limfocytów CD4⁺ in vitro.

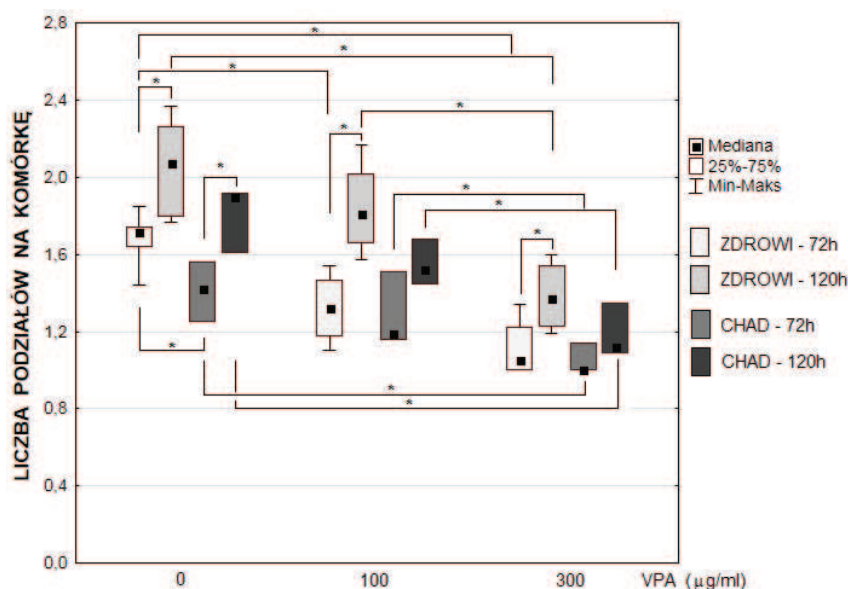
Podobne oznaczenia parametrów proliferacji limfocytów wykonano po stymulacji konkawaliną A w obecności różnych stężeń węglanu litu lub kwasu walproinowego in vitro według schematu opisanego w Materiale i Metodach w rozdziale 3.3.5.

Rycina 51 przedstawia zależność liczby podziałów przypadających na jedną komórkę limfocytów CD4⁺ u osób zdrowych i pacjentów z CHAD. Różne stężenia jonów litu nie wpływają na liczbę podziałów na komórkę po 72 godzinach u osób zdrowych, ale znacząco zwiększają ich liczbę po 120 godzinach – im wyższe stężenie węglanu litu, tym większa liczba podziałów na komórkę w tej grupie badanej. Z kolei u chorych widać, że wzrost stężenia węglanu litu zwiększa przede wszystkim liczbę podziałów na komórkę po 72 godzinach stymulacji, podczas gdy nie wpływa na ten parametr po 120 godzinach. Ponadto, można zauważyć, że limfocyty CD4⁺ chorych na CHAD charakteryzują się znacząco niższą liczbą podziałów przypadających na jedną komórkę po 72 godzinach hodowli z samą konkanawaliną A oraz 120 godzinach hodowli w towarzystwie 2 lub 5 mM jonów litu.



Rycina 51. Liczba podziałów na komórkę limfocytów CD4⁺ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{lit}}=4$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5 mM), test kolejności par Wilcozona, * $p<0,05$.

Z kolei, jak widać na Rycinie 52 chorzy leczeni kwasem walproinowym charakteryzują się zmiennie niższą liczbą podziałów na komórkę limfocytów $CD4^+$ w porównaniu do osób zdrowych, ale tylko po 72 godzinach stymulacji samą konkanawaliną A. Limfocyty $CD4^+$ osób zdrowych charakteryzują się znacznie niższą liczbą podziałów przypadających na jedną komórkę w obecności zwiększających się stężeń kwasu walproinowego. U pacjentów jedynie najwyższe stężenie (300 $\mu\text{g/ml}$) kwasu walproinowego zmiennie obniża liczbę podziałów na komórkę w porównaniu do liczby podziałów po stymulacji samą konkanawaliną A lub konkanawaliną A ze 100 $\mu\text{g/ml}$ kwasu walproinowego. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że limfocyty $CD4^+$ osób zdrowych charakteryzują się znacznie wyższą niż komórki pacjentów z CHAD liczbą podziałów w obecności samej konkanawaliny A.



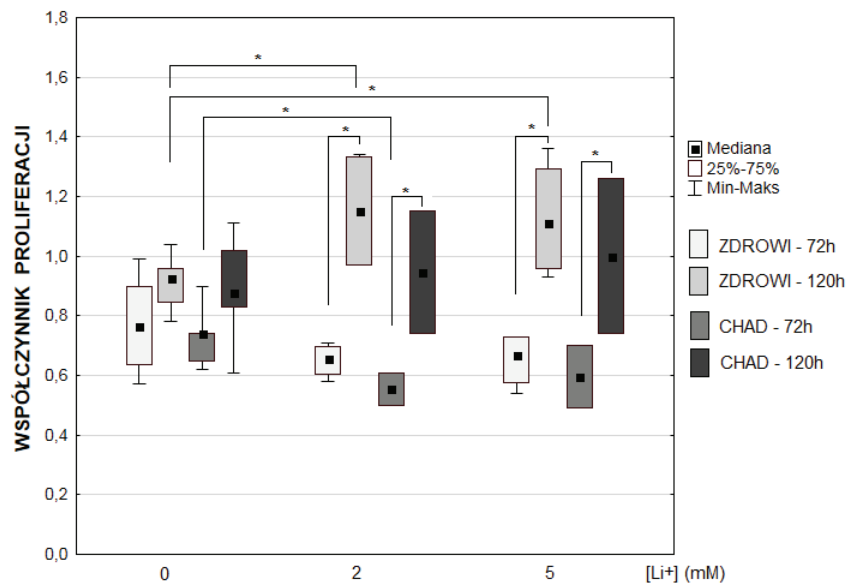
Rycina 52. Liczba podziałów na komórkę limfocytów $CD4^+$ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$), test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

Na rycinach 53 i 54 widać, że nie ma różnicy w wartości współczynnika proliferacji pomiędzy grupą kontrolną a chorymi na CHAD leczonymi odpowiednio węglanem litu lub kwasem walproinowym, których limfocyty $CD4^+$ stymulowane były jedynie konkanawaliną A. Nie ma też różnicy we współczynniku proliferacji w zależności od czasu stymulacji. Węglan litu w różny sposób modyfikuje współczynnik proliferacji u osób zdrowych i chorych na CHAD. Obecność węglanu litu w hodowli zmiennie zwiększa współczynnik proliferacji limfocytów $CD4^+$ osób zdrowych w 120 godzinie stymulacji, przy czym obydwa stężenia podnosiły go do podobnego poziomu (Rycina 53). Z

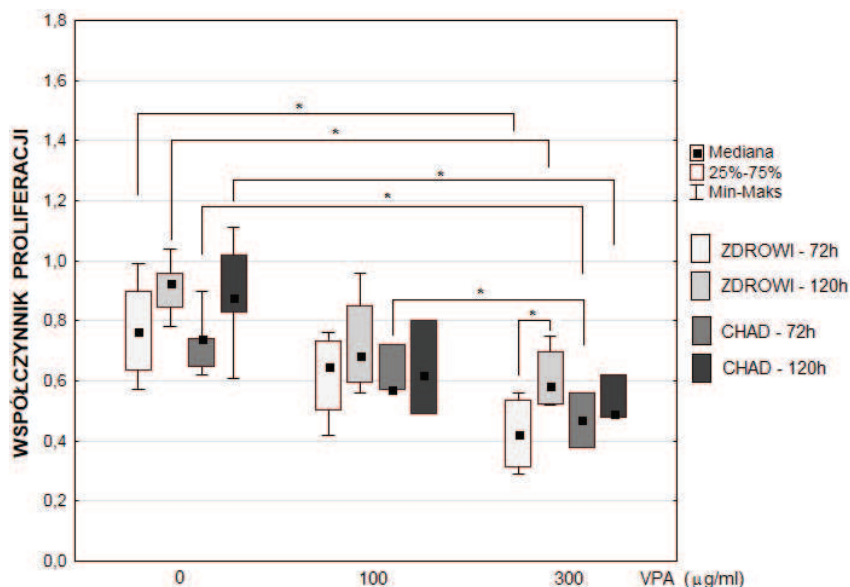
kolei, w przypadku chorych leczonych węglanem litu, jony litu w stężeniu 2 mM znamienne zmniejszały współczynnik proliferacji tej populacji komórek; stężenie 5 mM również obniżało współczynnik proliferacji po 72 godzinach, chociaż zmiana ta nie była statystycznie znamienne. Te zmiany z kolei, powodowały znamienne różnicę we współczynniku proliferacji w obu badanych grupach uzyskiwanych po 72 i 120 godzinach.

Tymczasem kwas walproinowy w stężeniu 300 $\mu\text{g/ml}$ obniżał współczynnik proliferacji limfocytów CD4^+ zarówno osób zdrowych jak i chorych leczonych kwasem walproinowym i po 72 i po 120 godzinach stymulacji (Rycina 54).

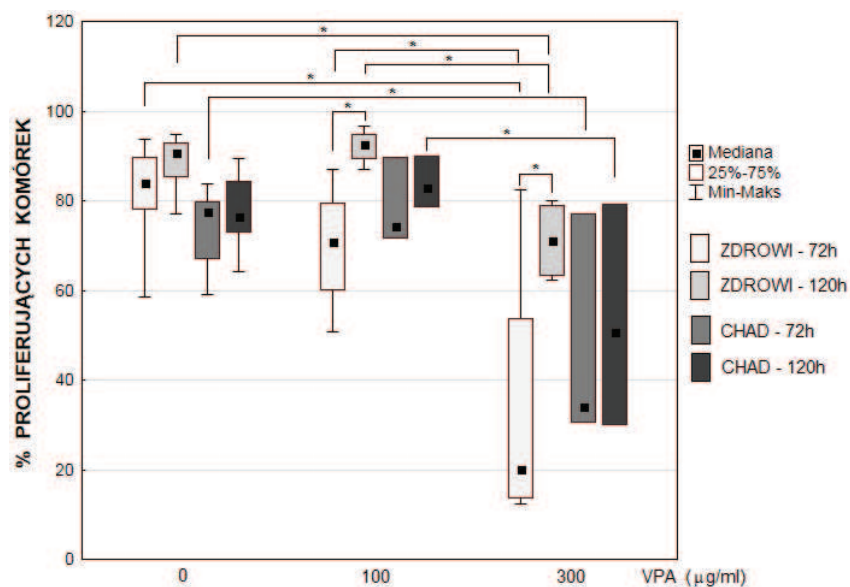
Hodowla komórek z węglanem litu nie wpływała na odsetek proliferujących limfocytów CD4^+ zarówno w przypadku osób zdrowych jak i chorych leczonych tym lekiem. Z kolei, kwas walproinowy w stężeniu 300 $\mu\text{g/ml}$ znacząco zmniejszał odsetek proliferujących komórek zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie chorych na CHAD (Rycina 55). Przy czym, w grupie osób zdrowych występowała też istotna różnica w odsetku proliferujących limfocytów CD4^+ w zależności od czasu stymulacji kwasem walproinowym.



Rycina 53. Współczynnik proliferacji limfocytów CD4^+ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{lit}}=4$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5 mM), test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



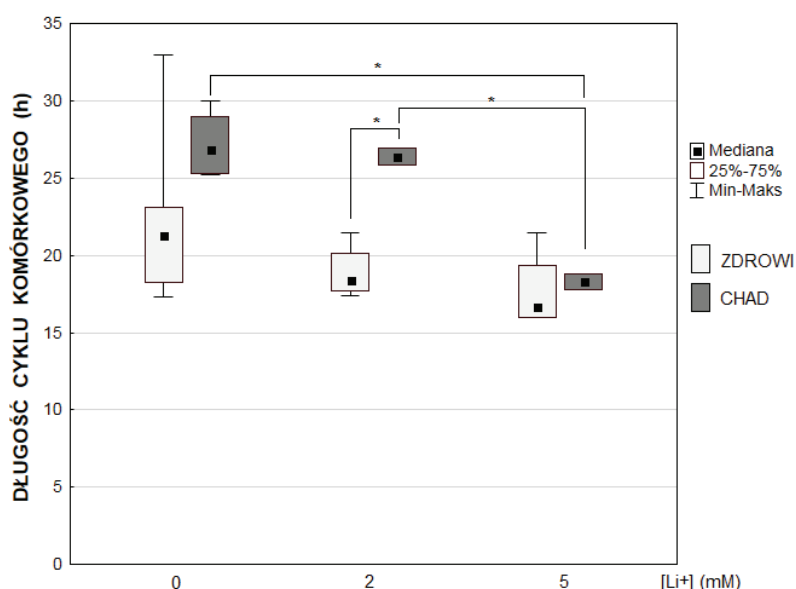
Rycina 54. Współczynnik proliferacji limfocytów CD4⁺ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 µg/ml), test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



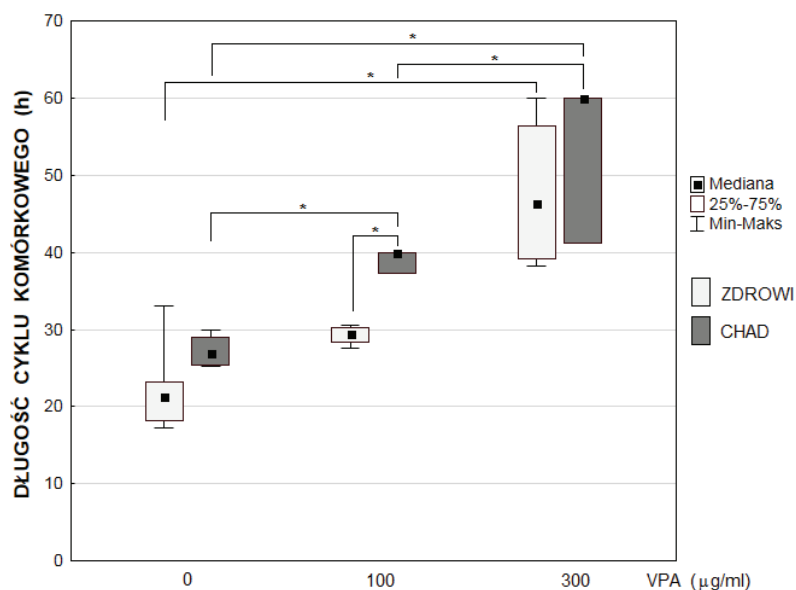
Rycina 55. Odsetek proliferujących limfocytów CD4⁺ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 µg/ml), test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

Kolejny parametr, długość cyklu komórkowego limfocytów $CD4^+$ ulegała znacznemu skróceniu w obecności 5 mM węglanu litu w grupie chorych leczonych tym lekiem (Rycina 56). W grupie kontrolnej spadek był niewielki, stąd też nie był znamieny statystycznie.

Tymczasem obecność kwasu walproinowego w obydwu stężeniach wydłużała znacząco długość cyklu komórkowego zarówno w grupie kontrolnej, jak i grupie chorych leczonych kwasem (Rycina 57). Ponieważ długość cyklu w sposób znaczący wpływa na wyżej opisane inne parametry cyklu komórkowego badanych komórek, dłuższy cykl komórkowy tłumaczyłby obserwowany spadek liczby podziałów na komórkę limfocytów $CD4^+$, spadek odsetka proliferujących komórek oraz spadek współczynnika proliferacji wykazanych w badanych grupach.



Rycina 56. Długość cyklu komórkowego limfocytów $CD4^+$ u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{lit}=4$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5 mM), test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



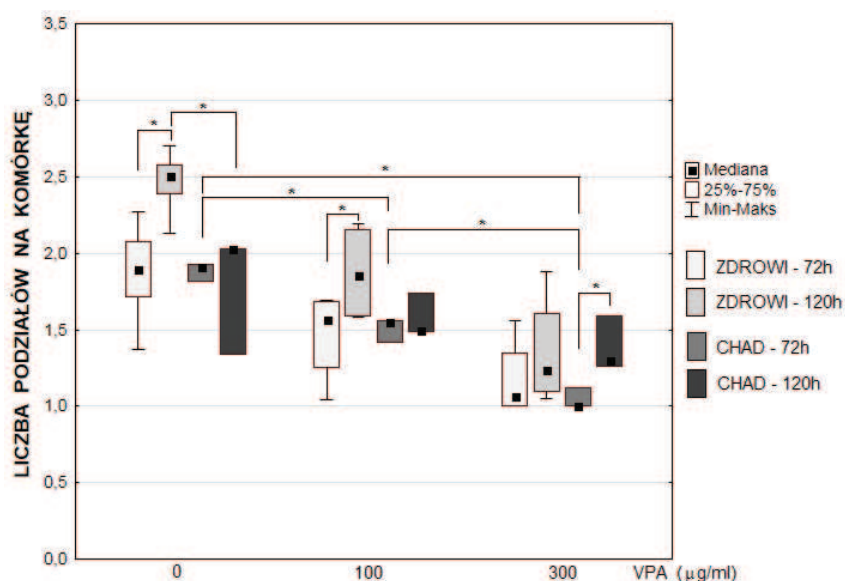
Rycina 57. Długość cyklu komórkowego limfocytów CD4⁺ u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 µg/ml), test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

4.4.3. Ocena wpływu leków normotymicznych na proliferację limfocytów CD8⁺ in vitro.

Te same parametry cyklu komórkowego analizowane były w badanych grupach dla populacji limfocytów CD8⁺.

I tak, nie wykazano żadnych zmian w liczbie podziałów na komórkę limfocytów CD8⁺ zarówno osób zdrowych jak i chorych leczonych węglanem litu w obecności jonów litu w różnych stężeniach w hodowli.

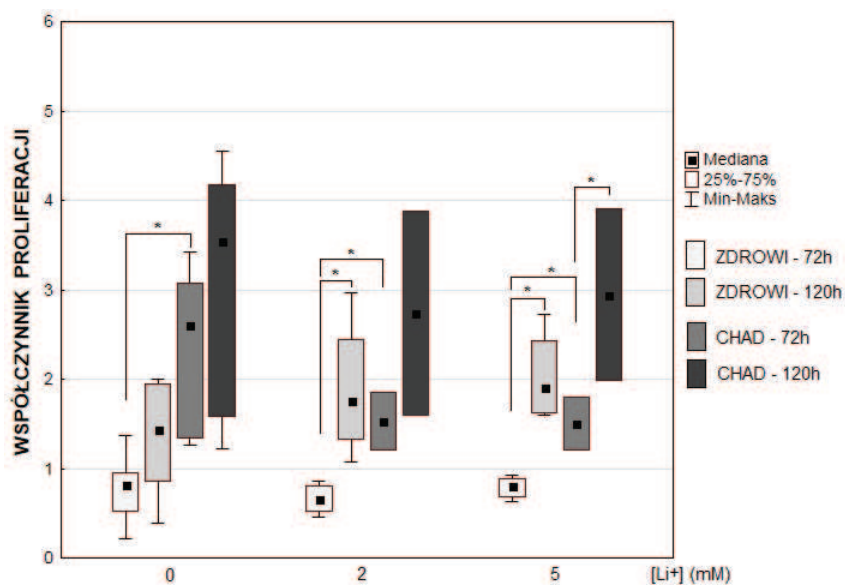
Jak widać na Rycinie 58 chorzy leczeni kwasem walproinowym charakteryzują się znamienne niższą liczbą podziałów na komórkę limfocytów CD8⁺ po 120 godzinach stymulacji samą konkanawaliną A w porównaniu do osób zdrowych. Liczba podziałów w tej badanej grupie spadała pod wpływem zwiększających się stężeń kwasu walproinowego; zmiana ta była statystycznie znamienna jednak tylko po 72 godzinach stymulacji. Mimo, że limfocyty CD8⁺ osób zdrowych również charakteryzowały się niższą liczbą podziałów przypadających na jedną komórkę w obecności zwiększających się stężeń kwasu walproinowego, zmiany te nie były statystycznie znamienne.



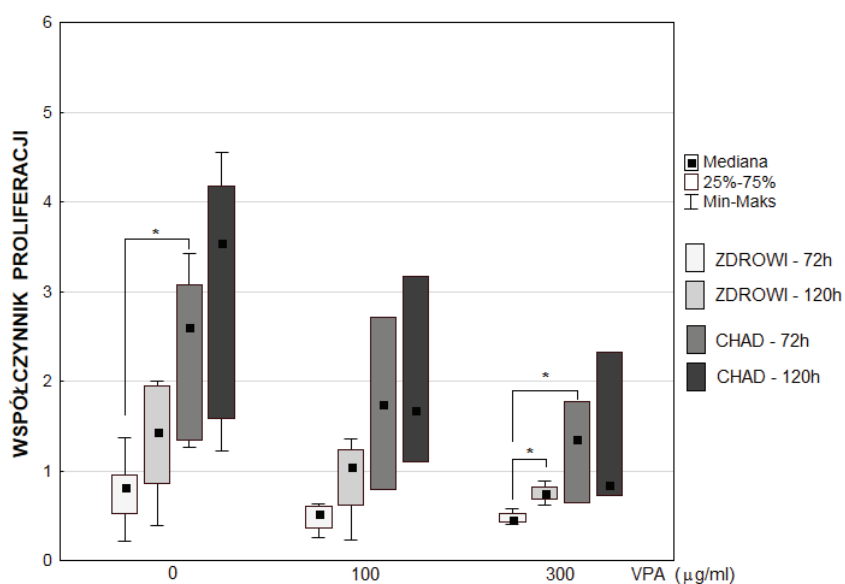
Rycina 58. Liczba podziałów na komórkę limfocytów CD8⁺ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 µg/ml), test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

Współczynnik proliferacji limfocytów CD8⁺ stymulowanych konkanawaliną A chorych na CHAD leczonych węglanem litu był po 72 godzinach znamienne wyższy w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 59). Choć obecność jonów litu w różnych stężeniach w hodowli wydawała się nie wpływać na ten parametr w badanych grupach, można było zauważyć pogłębienie się różnicy we współczynniku w zależności od czasu stymulacji badanym lekiem.

Współczynnik proliferacji badanej populacji chorych przyjmujących kwas walproinowy był również znamienne wyższy po 72 godzinach stymulacji konkanawaliną A w porównaniu do osób zdrowych (Rycina 60). I podobnie jak w przypadku węglanu litu, obecność w hodowli komórkowej zwiększających się stężeń badanego leku wydaje się nie wpływać na ten parametr w badanych grupach.



Rycina 59. Współczynnik proliferacji limfocytów CD8⁺ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{lit}}=4$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5 mM), test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.

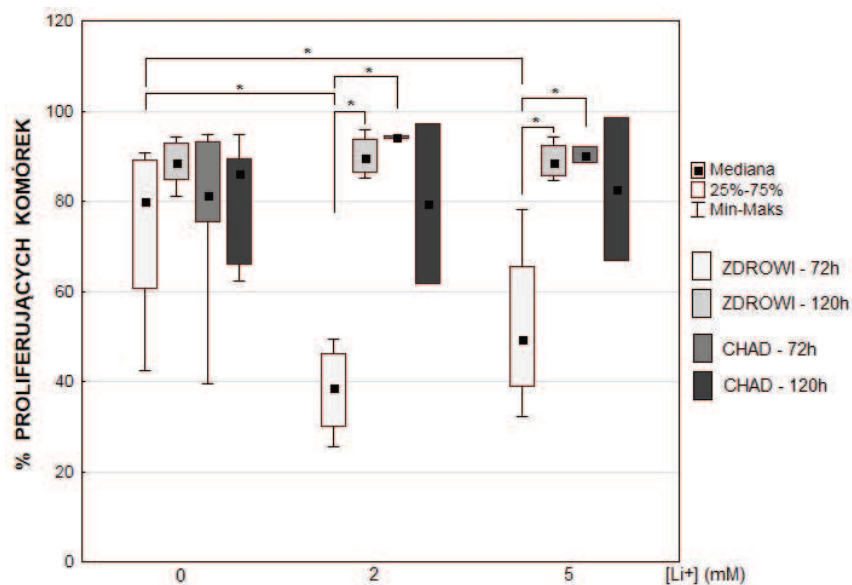


Rycina 60. Współczynnik proliferacji limfocytów CD8⁺ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 µg/ml), test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.

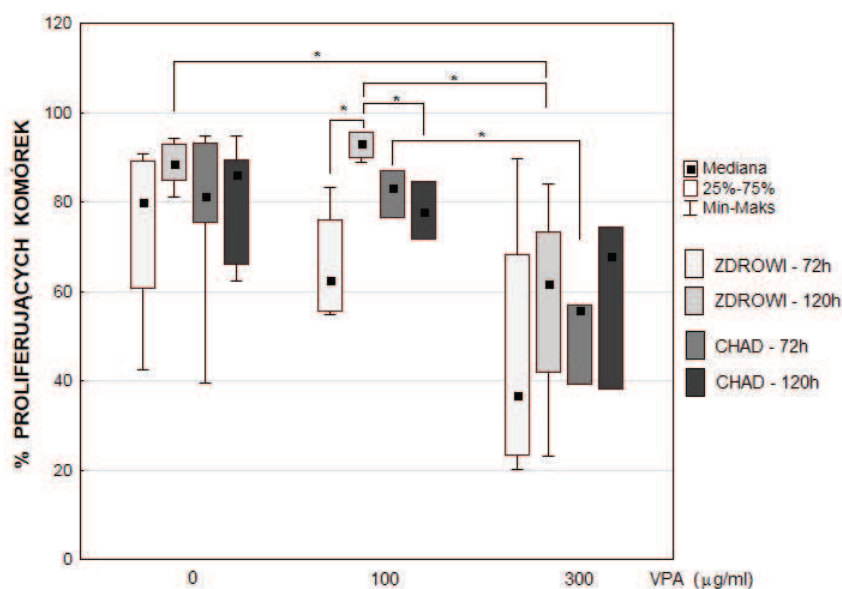
Jak widać na rycinie 61 i 62, nie ma różnic w odsetku proliferujących limfocytów CD8⁺ pomiędzy grupą kontrolną a chorymi na CHAD leczonymi odpowiednio węglanem litu lub kwasem walproinowym. Obecność jonów litu w hodowli komórkowej w obydwu zastosowanych stężeniach bardzo znamienne obniżyła odsetek proliferujących limfocytów CD8⁺ osób zdrowych po 72 godzinach stymulacji, ale 120 godzinach wartość ta wracała do poziomu obserwowanego po samej stymulacji konkanawaliną (Rycina 61). U chorych na CHAD nie wykazano znaczącego wpływu węglanu litu na odsetek proliferujących komórek.

Z kolei, kwas walproinowy jedynie w najwyższym (300 µg/ml) stężeniu obniżał znacznie odsetek limfocytów CD8⁺ osób zdrowych po 120 godzinach stymulacji w porównaniu do stymulacji jedynie konkanawaliną A (Rycina 62). Natomiast u chorych leczonych kwasem wykazano znamienny spadek w odsetku tych komórek jedynie po 72 godzinach stymulacji w porównaniu do odsetka komórek stymulowanych w obecności 100 µg/ml kwasu walproinowego.

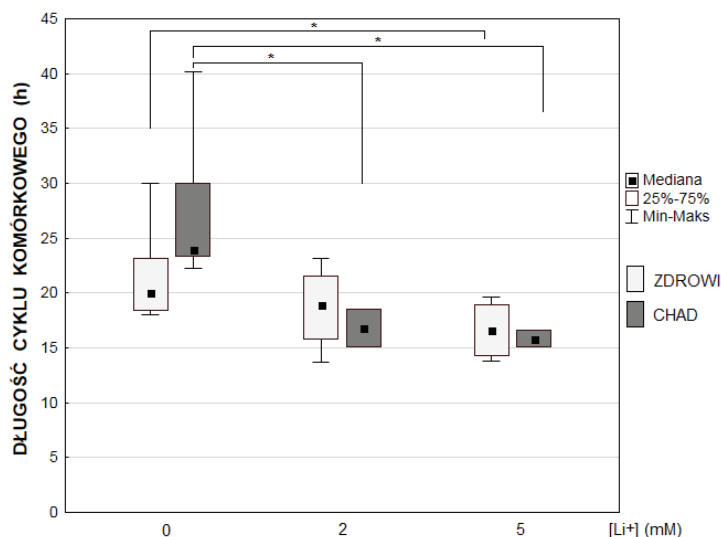
Zmiany w długości cyklu komórkowego limfocytów CD8⁺ w obecności badanych leków normotymicznych były podobne do zmian w długość cyklu komórkowego limfocytów CD4⁺, tzn. długość cyklu komórkowego limfocytów CD8⁺ ulegała znacznemu skróceniu w obecności 2 i 5 mM węglanu litu w grupie chorych leczonych tym lekiem (Rycina 63). W grupie kontrolnej skrócenie cyklu komórkowego było statystycznie znacznie w obecności 5 mM jonów litu. Z kolei obecność kwasu walproinowego w obydwu stężeniach wydłużała znacząco długość cyklu komórkowego zarówno w grupie kontrolnej, jak i grupie chorych leczonych kwasem walproinowym (Rycina 64).



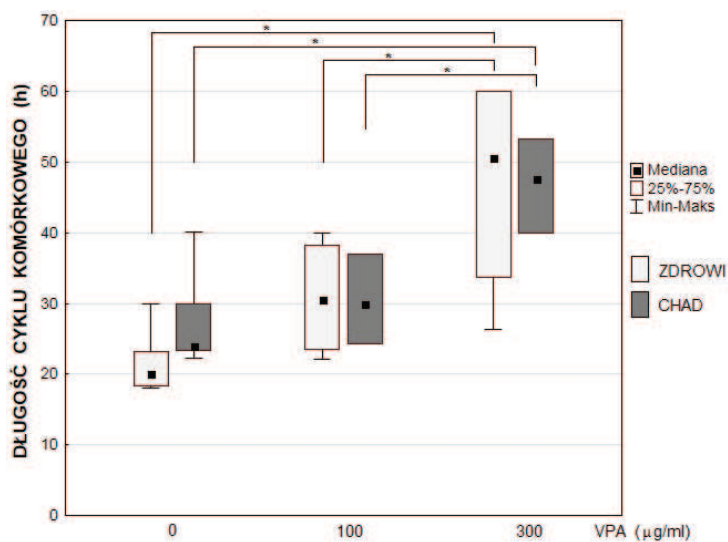
Rycina 61. Odsetek proliferujących limfocytów CD8⁺ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5 mM), test kolejności par Wilcozona, * $p<0,05$.



Rycina 62. Odsetek proliferujących limfocytów CD8⁺ po 72 i 120 godzinach u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 µg/ml), test kolejności par Wilcozona, * $p<0,05$.



Rycina 63. Długość cyklu komórkowego limfocytów CD8⁺ u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5 mM), test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



Rycina 64. Długość cyklu komórkowego limfocytów CD8⁺ u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=5$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 µg/ml), test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.

4.5. Ocena wpływu leków normotymicznych na apoptozę PBMC.

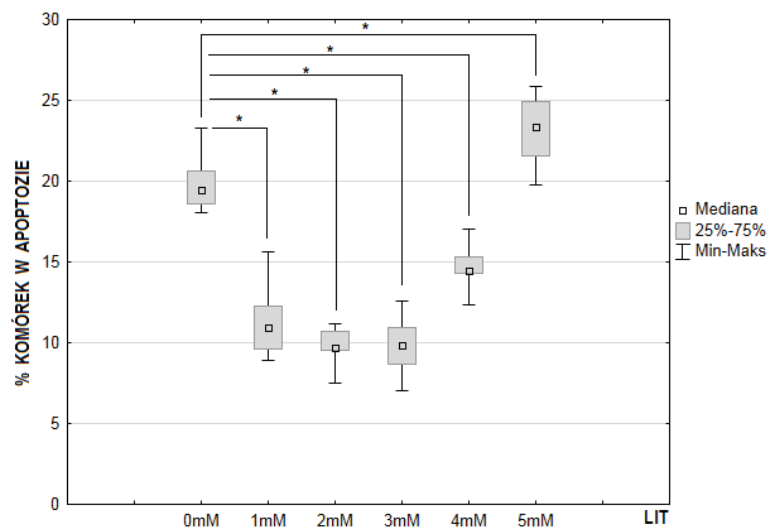
Apoptozę indukowaną aktywacją (ang. *activation induced cell death*, AICD), która jest konsekwencją stymulacji PBMC konkanawaliną A, jak i indukowaną czynnikami proapoptotycznymi (kamptotecyną oraz nadtlaniem wodoru) oceniano dwoma różnymi metodami: za pomocą barwnika JC-1 lub aneksyny V z jodkiem propidyny (PI) opisanymi w Materiałach i Metodach w rozdziale 3.3.7.

4.5.1. Ocena wpływu leków normotymicznych na apoptozę PBMC osób zdrowych *in vitro*.

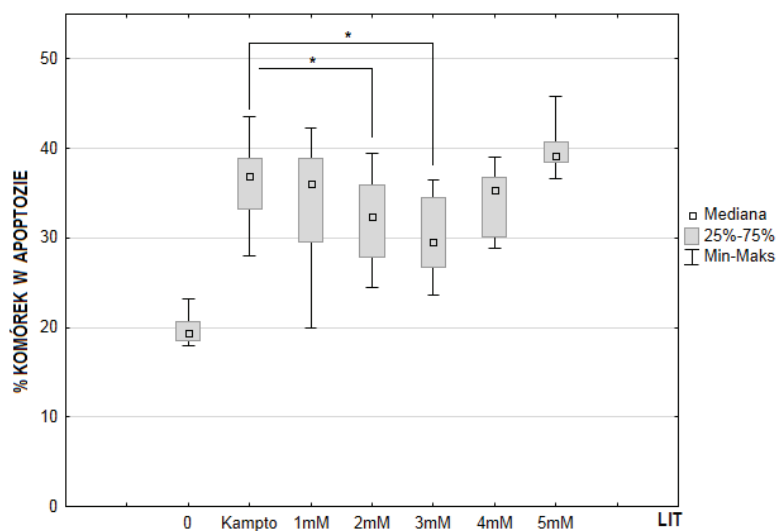
Na wstępie oceniono wpływ leków normotymicznych na apoptozę indukowaną aktywacją PBMC osób zdrowych. Barwienie z użyciem JC-1 wykazało, że węglan litu dodany do środowiska hodowlanego wykazują silne działanie cytoprotekcyjne w zakresie stężeń 1-4 mM; największe stężenie jonów litu (5 mM) wykazuje natomiast działanie proapoptotyczne (Rycina 65). Oznaczanie apoptozy aneksyną V dało podobne wyniki; węglan litu w stężeniach 1-3 mM działa cytoprotekcyjnie na badane komórki, natomiast stężenie 5 mM – proapoptotycznie (Rycina 68).

Następnie komórki hodowano w obecności czynników proapoptotycznych: kamptotecyny lub nadtlenu wodoru. Kamptotecyna powodowała znaczny wzrost odsetka komórek apoptotycznych, co potwierdza zarówno barwienie z użyciem JC-1, jak i aneksyną V; w obu przypadkach obserwowano znamienne statystycznie cytoprotekcyjne działanie jonów litu (Ryciny 66 i 69). Cytoprotekcyjny wpływ węglanu litu jest jednak ograniczony, ponieważ odsetek komórek apoptotycznych nie osiąga wartości obserwowanych przy braku kamptotecyny w hodowli (Rycina 66).

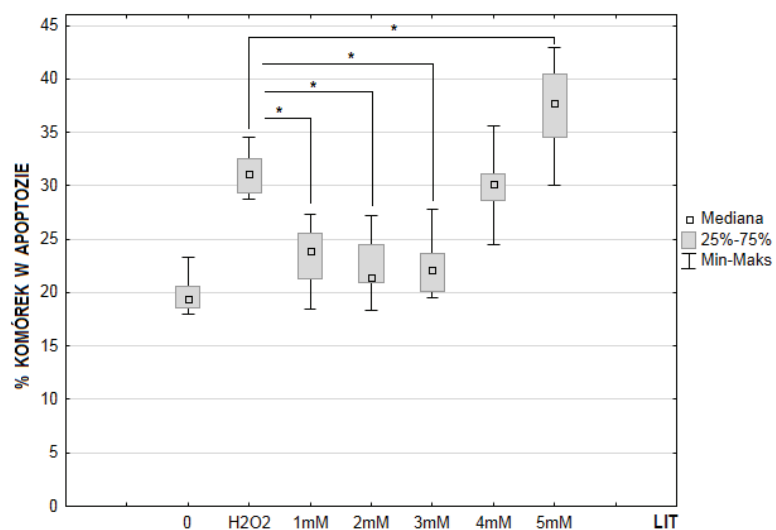
Stosując jako czynnik wywołujący śmierć komórki nadtlenek wodoru otrzymujemy różne wyniki w zależności od stosowanej metody oznaczenia apoptozy. Barwienie z użyciem JC-1 wykazało, że węglan litu w stężeniu 1-3 mM obniża odsetek komórek apoptotycznych, podczas gdy najwyższe stężenie 5mM podwyższa odsetek komórek apoptotycznych (Rycina 67). Barwienie z użyciem aneksyny V wykazało, że jony litu w stężeniu 3-5mM powodują wzrost odsetka komórek apoptotycznych (Rycina 70).



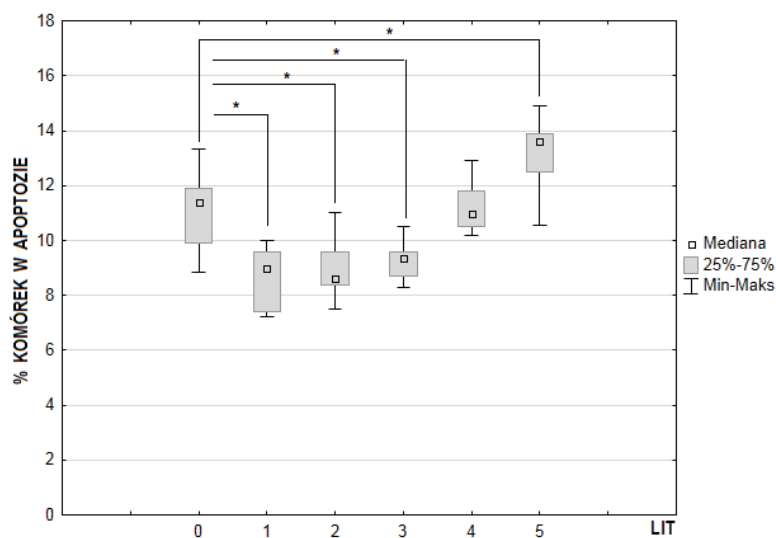
Rycina 65. Odsetek PBMC ulegających apoptozie indukowanej aktywacją w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5mM). Barwienie z użyciem JC-1, $n_{zdrowi}=10$; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



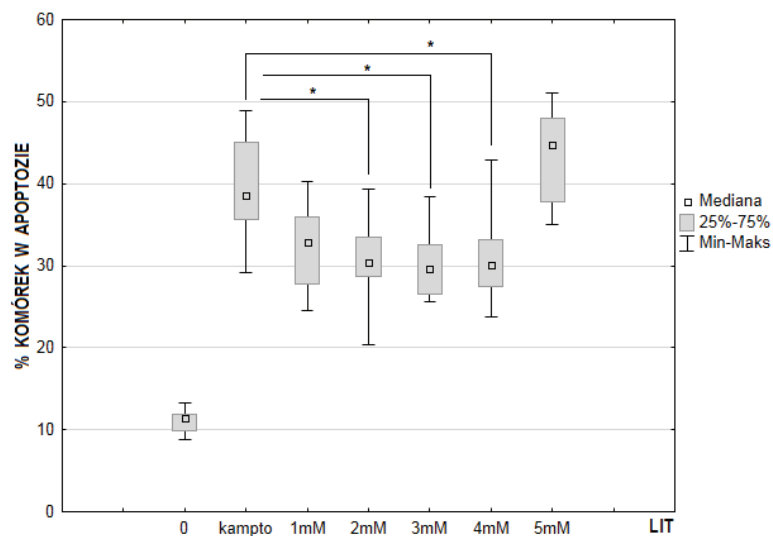
Rycina 66. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej kamptotecyną w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5mM). Barwienie z użyciem JC-1, $n_{zdrowi}=10$; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



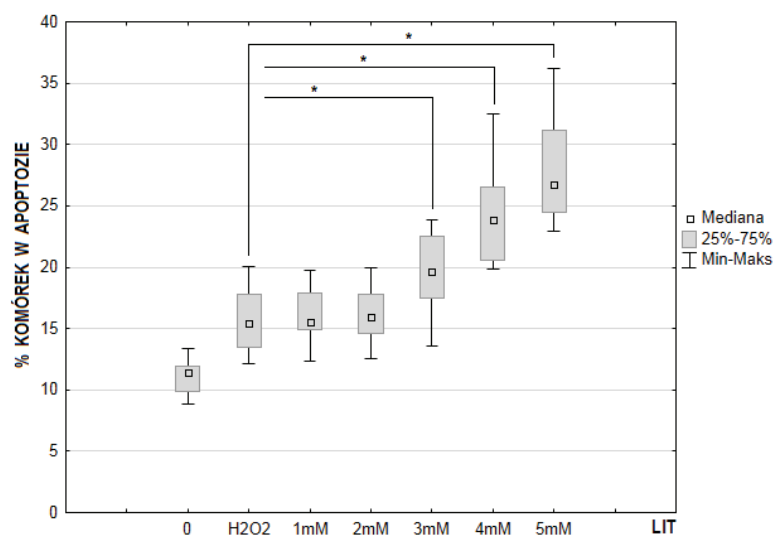
Rycina 67. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej nadtlaniem wodoru w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5mM). Barwienie z użyciem JC-1, $n_{zdrowi}=10$; test kolejności par Wilcozona, * $p<0,05$.



Rycina. 68. Odsetek PBMC ulegających apoptozie indukowanej aktywacją w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5mM). Barwienie z użyciem aneksyny V, $n_{zdrowi}=10$; test kolejności par Wilcozona, * $p<0,05$.



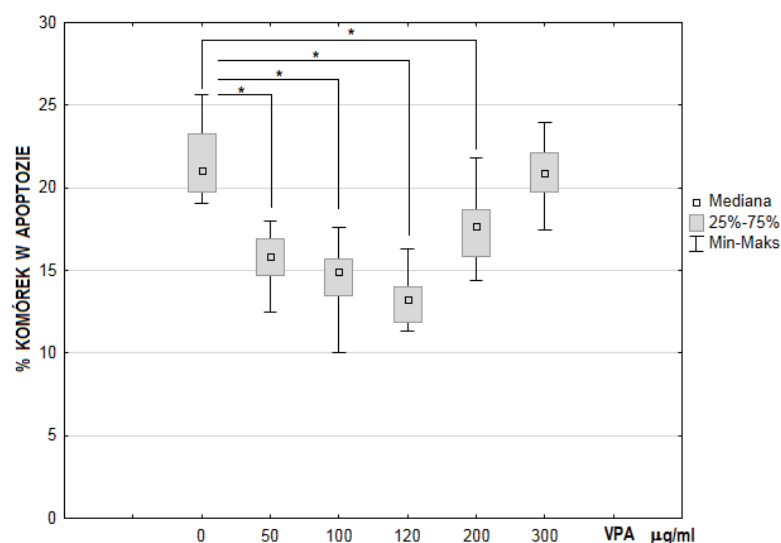
Rycina 69. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej kamptotecyną w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5mM). Barwienie z użyciem aneksyny V, $n_{zdrowi}=10$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



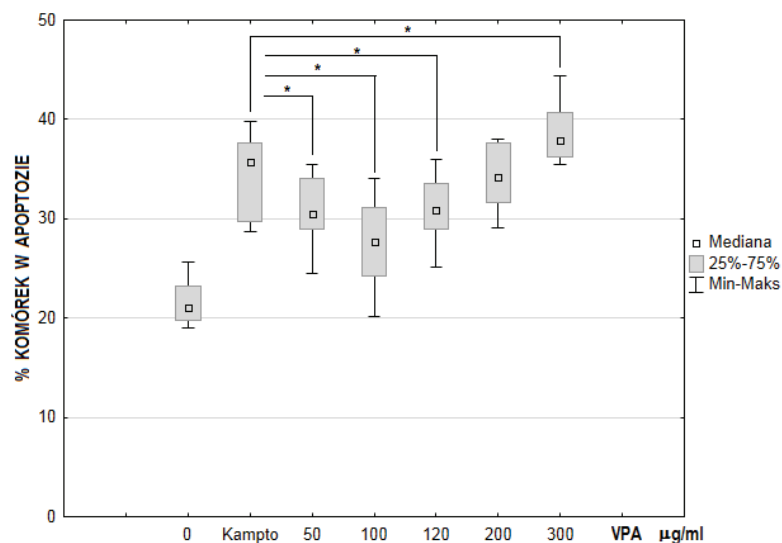
Rycina 70. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej nadtlaniem wodoru w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0-5mM). Barwienie z użyciem aneksyny V, $n_{zdrowi}=10$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

Barwienie z użyciem JC-1 wykazało, że kwas walproinowy wykazuje działanie cytoprotekcyjne w szerokim zakresie stężeń 50-200 $\mu\text{g/ml}$. Dotyczy do zarówno apoptozy indukowanej samą aktywacją (Rycina 71), jak i indukowanej kamptotecyną (Rycina 72) lub nadtlenkiem wodoru (Rycina 73). Jednak w stężeniu 300 $\mu\text{g/ml}$ kwas walproinowy nie obniża odsetka komórek apoptotycznych (Rycina 71) a nawet go zwiększa w obecności kamptotecyny lub nadtlenku wodoru (Rycina 72 i 73).

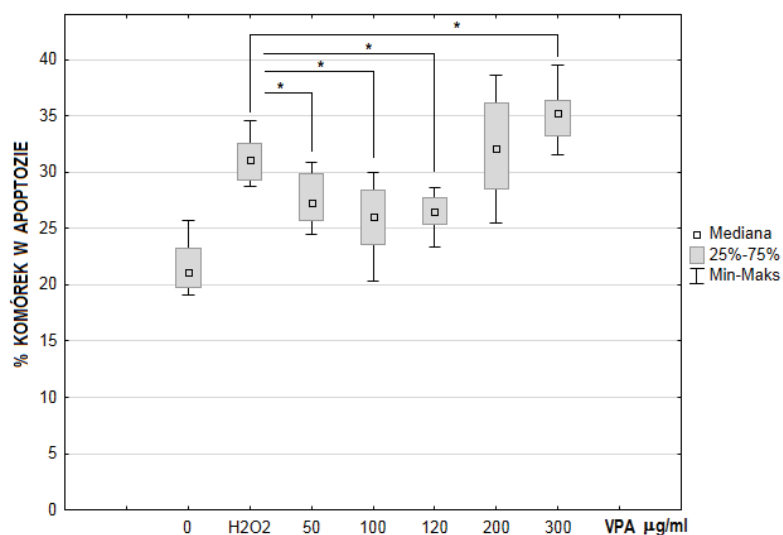
Oznaczanie apoptozy z użyciem aneksyny V wykazało, że kwas walproinowy obniża odsetek komórek apoptotycznych jedynie w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Zastosowanie kwasu walproinowego w stężeniu 120-300 $\mu\text{g/ml}$ zwiększa odsetek komórek apoptotycznych (Rycina 74). W obecności kamptotecyny kwas walproinowy obniża odsetek komórek apoptotycznych w stężeniu 50-100 $\mu\text{g/ml}$; w wyższych stężeniach nie zmienia odsetka komórek apoptotycznych (Rycina 75). W obecności nadtlenku wodoru kwas walproinowy również obniża odsetek komórek apoptotycznych w stężeniu 50-100 $\mu\text{g/ml}$, ale w wyższych stężeniach działa proapoptotycznie na badane komórki (Rycina 76).



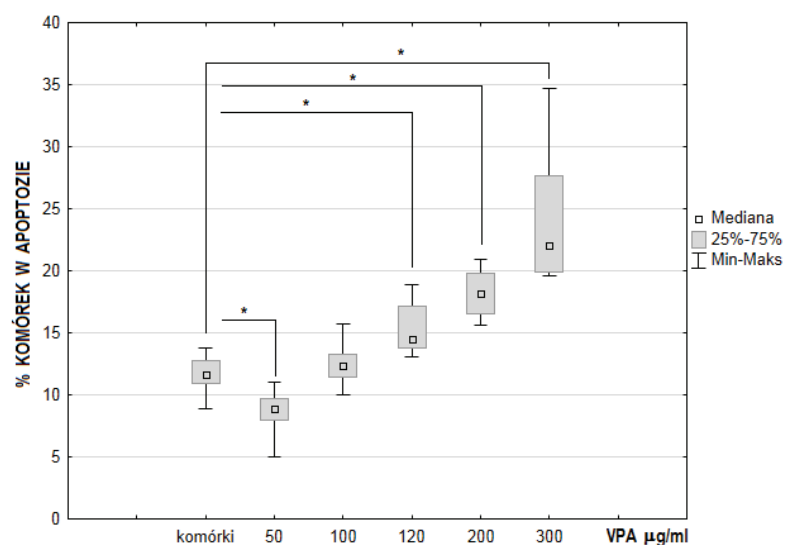
Rycina 71. Odsetek PBMC ulegających apoptozie indukowanej aktywacją w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem JC-1, $n_{\text{zdrowi}}=10$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



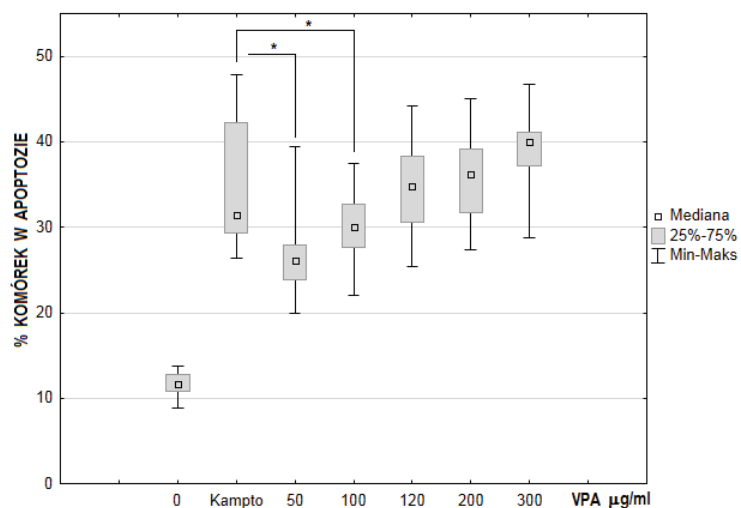
Rycina 72. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej kamptotecyną w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem JC-1, $n_{\text{zdrowi}}=10$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



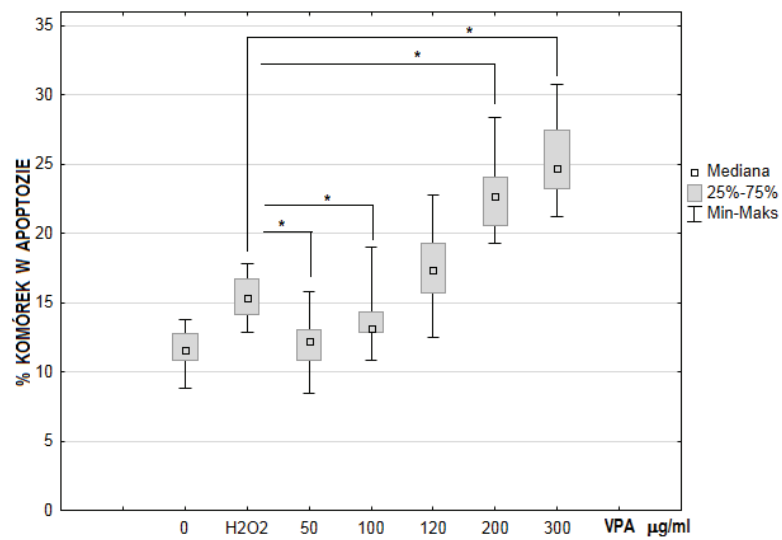
Rycina 73. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej nadtlaniem wodoru w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem JC-1, $n_{\text{zdrowi}}=10$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



Rycina 74. Odsetek PBMC ulegających apoptozie indukowanej aktywacją w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem aneksyny V, $n_{\text{zdrowi}}=10$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



Rycina 75. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej kamptotecyną w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem aneksyny V, $n_{\text{zdrowi}}=10$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



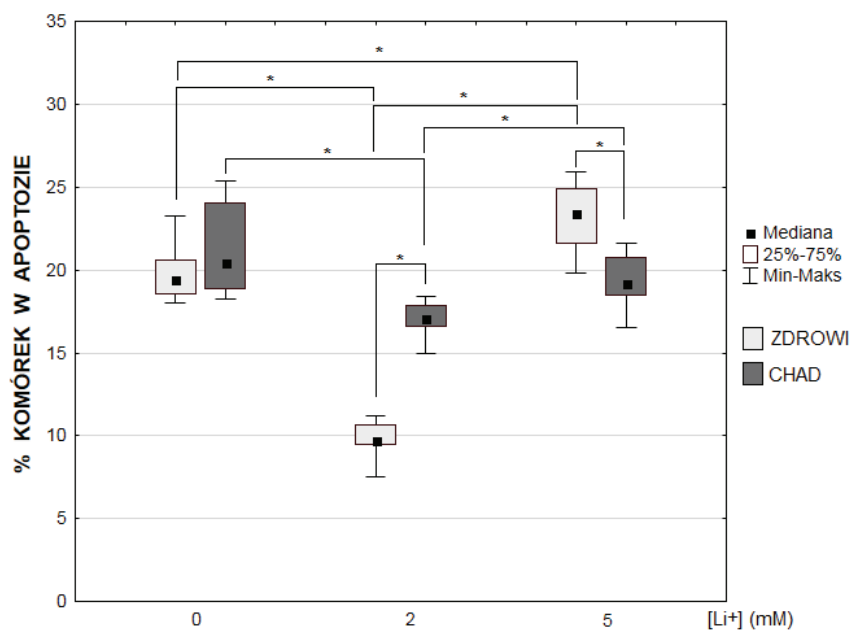
Rycina 76. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej nadtlaniem wodoru w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem aneksyny V, $n_{\text{zdrowi}}=10$; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

4.5.2. Porównanie wpływu leków normotymicznych na apoptozę PBMC osób zdrowych i chorych *in vitro*.

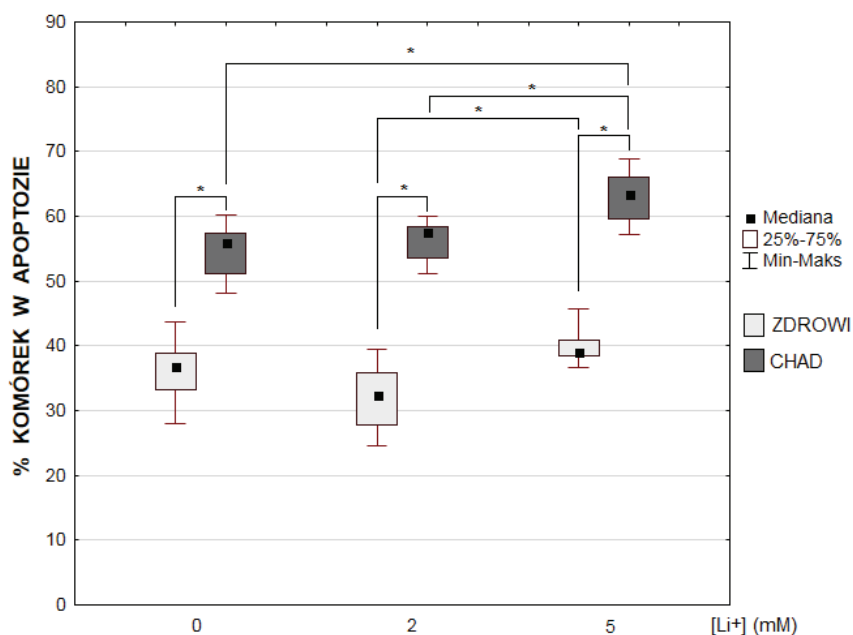
Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, jak leki normotymiczne wpływają na apoptozę PBMC u osób chorych na CHAD. Komórki chorych leczonych węglanem litu były inkubowane w obecności wybranych stężeń jonów litu, natomiast komórki chorych leczonych kwasem walproinowym były odpowiednio traktowane wybranymi stężeniami kwasu walproinowego.

Barwienie z użyciem JC-1 nie wykazało różnic pomiędzy odsetkiem komórek ulegających apoptozie indukowanej aktywacją pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na CHAD leczonymi węglanem litu. Zastosowanie jonów litów w stężeniu 2 mM powodowało spadek odsetka komórek apoptotycznych zarówno u zdrowych, jak i chorych na CHAD, przy czym spadek ten był zdecydowanie niższy u pacjentów (Rycina 77). Stężenie 5 mM węglanu litu nie powodowało wzrostu odsetka komórek apoptotycznych u chorych (Rycina 77). Kamptotecyna indukuje znamienne wzrost odsetka komórek apoptotycznych u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 78). Węglan litu w stężeniu 2 mM nie wykazuje działania cytoprotekcyjnego; w stężeniu 5 mM uwidacznia się jego działanie proapoptotyczne, ponieważ zwiększa się odsetek komórek apoptotycznych u pacjentów (Rycina 78). Zastosowanie nadtlenu wodoru jako czynnika indukującego apoptozę również indukuje istotny wzrost odsetka komórek apoptotycznych u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 79). Węglan litu w stężeniu 2 mM w obu grupach badanych wykazuje proporcjonalny spadek odsetka komórek apoptotycznych, w stężeniu 5 mM obniża odsetek komórek apoptotycznych jedynie u chorych na CHAD (Rycina 79).

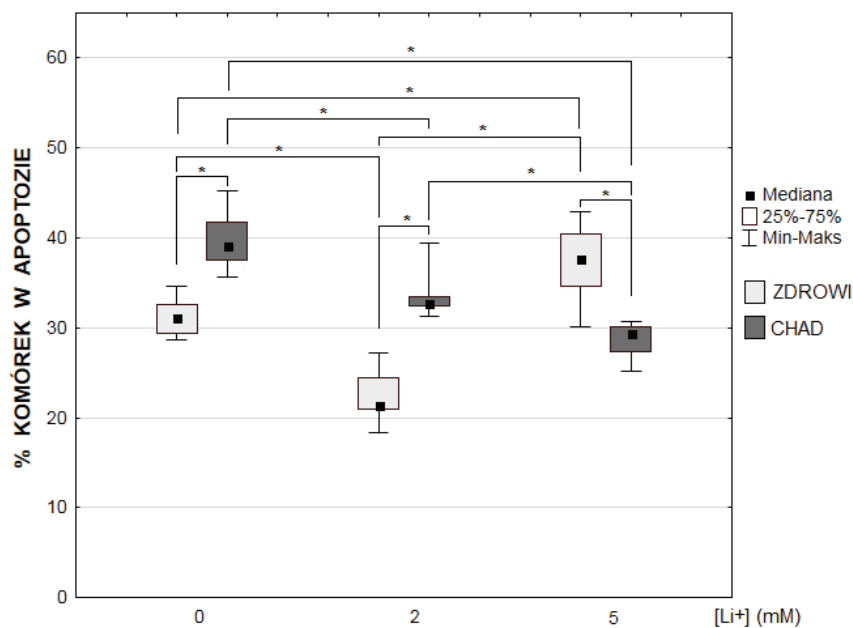
Barwienie aneksyną V wykazało, że odsetek komórek ulegających apoptozie indukowanej aktywacją jest znamienne wyższy u chorych na CHAD w porównaniu do osób zdrowych a węglan litu w stężeniu 2 mM działa cytoprotekcyjnie w obydwu grupach badanych (Rycina 80). Jony litu w stężeniu 5 mM obniżają też znamienne odsetek komórek apoptotycznych ale tylko u chorych na CHAD (Rycina 80). W obecności kamptotecyny, węglan litu w stężeniu 2 mM istotnie obniża odsetek komórek apoptotycznych w obydwu grupach badanych; jony litu w stężeniu 5 mM obniżają odsetek komórek apoptotycznych jedynie u chorych na CHAD (Rycina 81). Stosując barwienie aneksyną V wykazano również, że nadtlenek wodoru bardzo znamienne zwiększa odsetek komórek apoptotycznych u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 82). Węglan litu w stężeniu 5 mM u osób zdrowych zwiększa odsetek komórek apoptotycznych (Rycina 82).



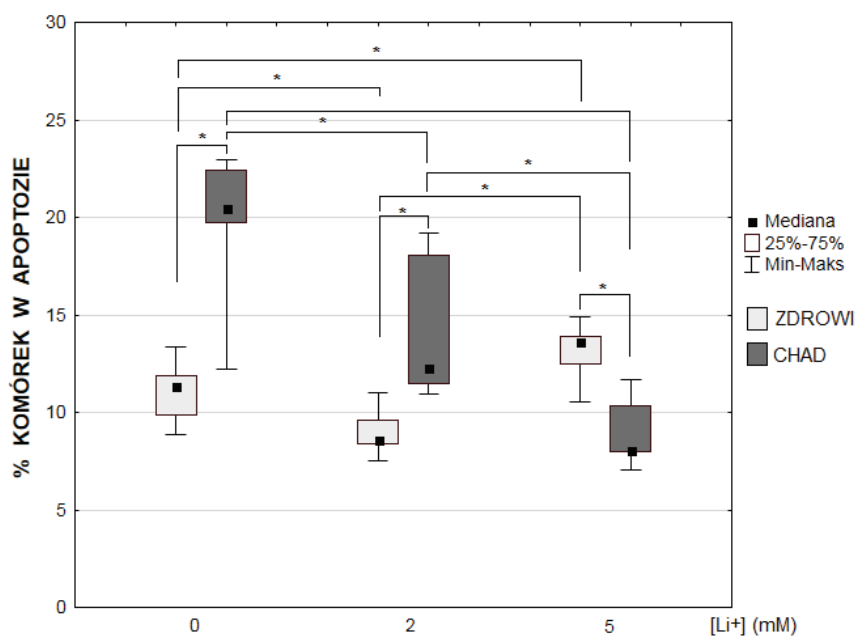
Rycina 77. Odsetek PBMC ulegających apoptozie indukowanej aktywacją u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{lit}}=6$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0, 2 lub 5 mM). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



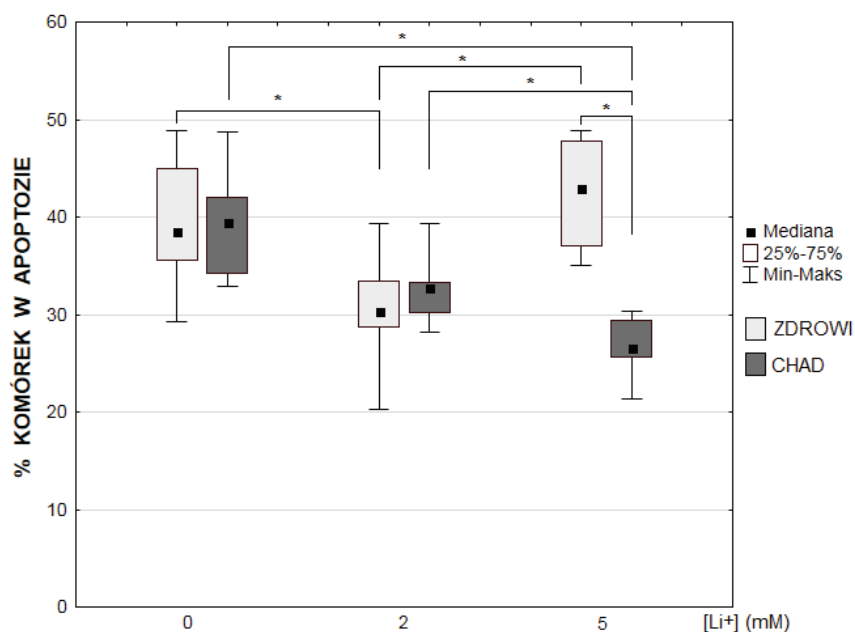
Rycina 78. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej kamptotecyną u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{lit}}=6$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0, 2 lub 5 mM). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



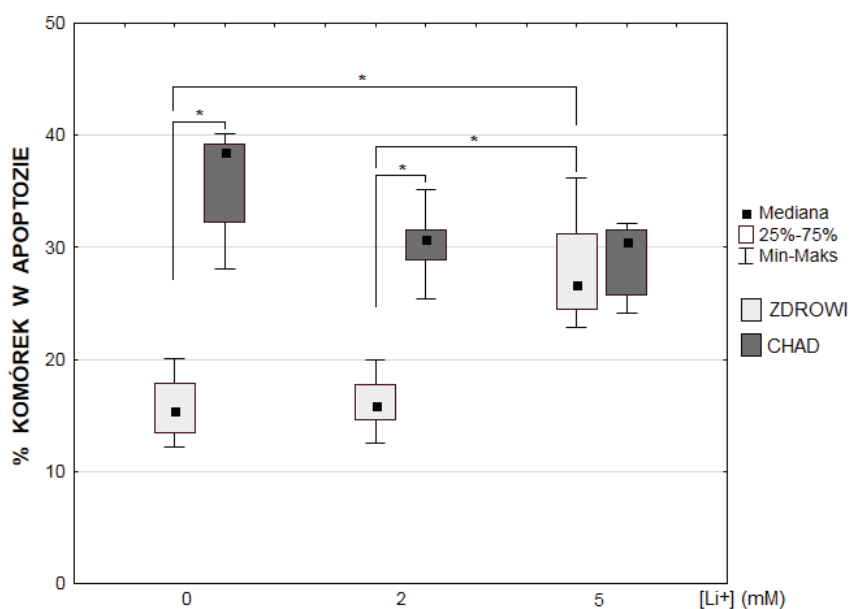
Rycina 79. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej nadtlenkiem wodoru u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{lit}=6$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0, 2 lub 5 mM). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



Rycina 80. Odsetek PBMC ulegających apoptozie indukowanej aktywacją u osób zdrowych ($n_{zdrowi}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{lit}=6$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0, 2 lub 5 mM). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



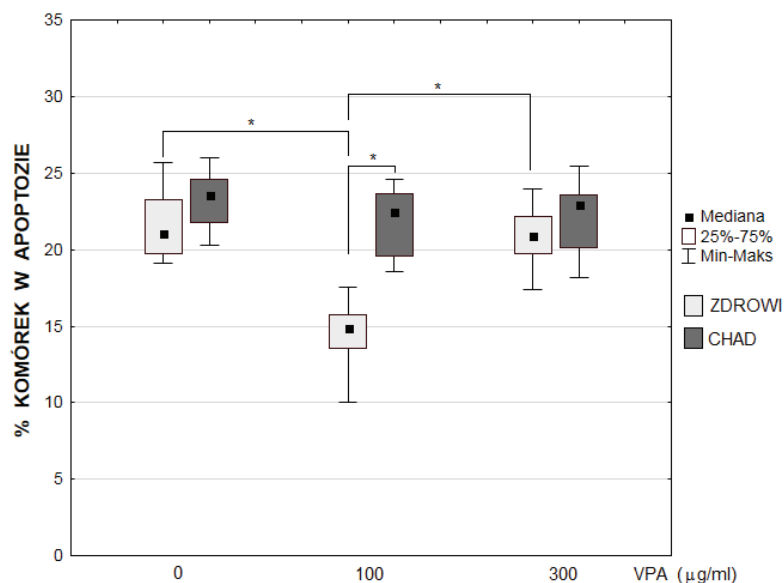
Rycina 81. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej kamptotecyną u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{lit}}=6$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0, 2 lub 5 mM). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.



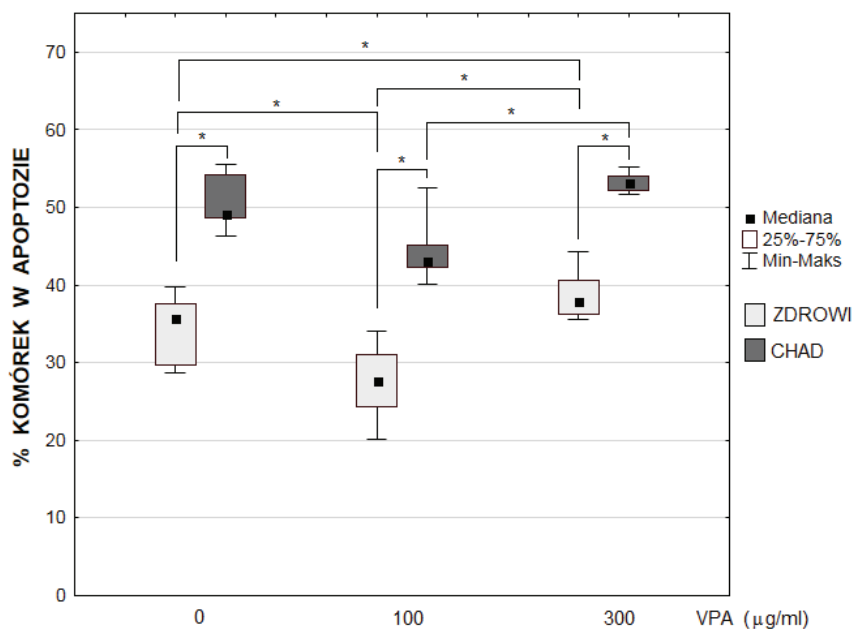
Rycina 82. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej nadtlutkiem wodoru u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących węglan litu ($n_{\text{lit}}=6$) w zależności od użytego stężenia węglanu litu (0, 2 lub 5 mM). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxona, * $p<0,05$.

Podobną analizę wykonano dla chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy, przy czym z hodowli PBMC zastosowano też odpowiedni lek normotymiczny. Zastosowanie barwnika JC-1 nie wykazało różnicy pomiędzy odsetkiem komórek ulegających apoptozie indukowanej aktywacją pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na CHAD leczonymi kwasem walproinowym. Spadek odsetka komórek apoptotycznych obserwowano jedynie u osób zdrowych w obecności kwasu walproinowego w stężeniu 100 µg/ml (Rycina 83). Zastosowanie kamptotecyny jako czynnika proapoptotycznego powodowało znamieny wzrost odsetka komórek apoptotycznych u chorych na CHAD w porównaniu do osób zdrowych. Kwas walproinowy w stężeniu 100 µg/ml obniżał odsetek komórek apoptotycznych w obu badanych grupach; jednak był on znamieny tylko u osób zdrowych (Rycina 84). Kwas walproinowy w stężeniu 100 µg/ml w obecności nadtlenu wodoru obniżał odsetek komórek apoptotycznych u osób zdrowych a w stężeniu 300 µg/ml podwyższał w obydwu grupach badanych (Rycina 85).

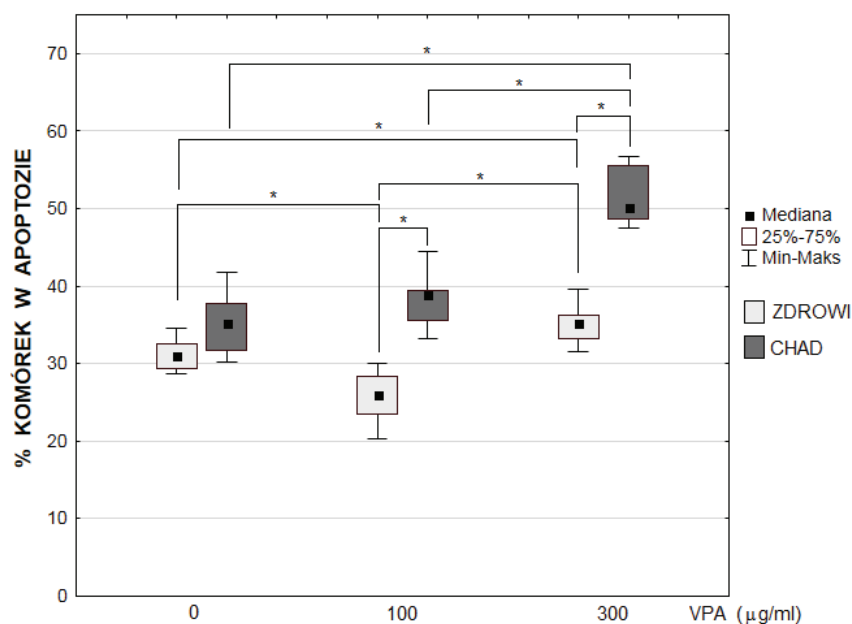
Barwienie aneksyną V wykazało, że odsetek komórek ulegających apoptozie indukowanej aktywacją jest znamienne wyższy u chorych na CHAD leczonych kwasem walproinowym w porównaniu do osób zdrowych a obecność kwasu walproinowego w stężeniu 300 µg/ml, zwiększała odsetek komórek apoptotycznych; przy czym tylko u osób zdrowych była to statystycznie istotna zmiana (Rycina 86). W obecności kamptotecyny kwas walproinowy w stężeniu 100 µg/ml wykazywał znamienne działanie cytoprotekcyjne zarówno u osób zdrowych, jak i chorych (Rycina 87). Natomiast w obecności nadtlenu wodoru kwas walproinowy w stężeniu 100 µg/ml istotnie obniżał a w stężeniu 300 µg/ml zwiększał odsetek komórek apoptotycznych w obu badanych grupach (Rycina 88).



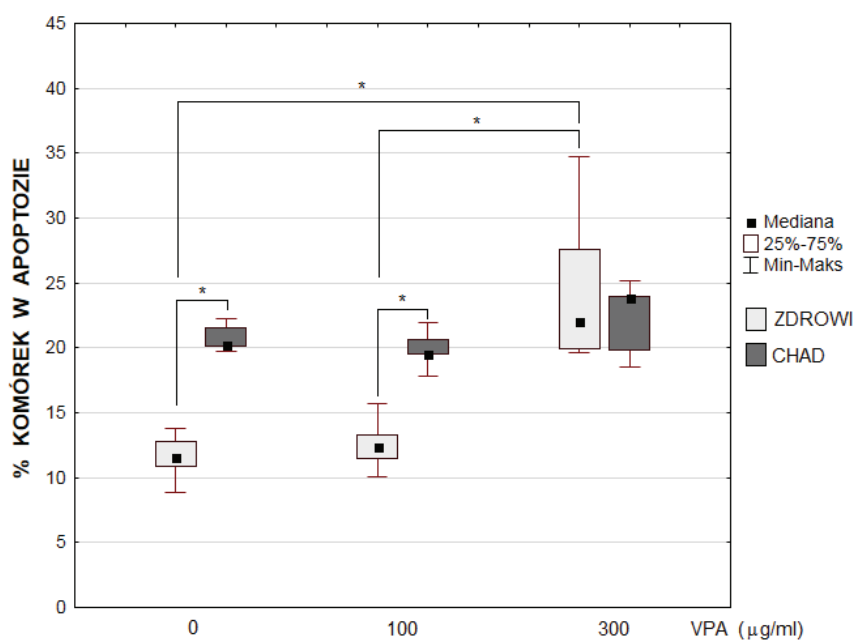
Rycina 83. Odsetek PBMC ulegających apoptozie indukowanej aktywacją u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0, 100 lub 300 µg/ml). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



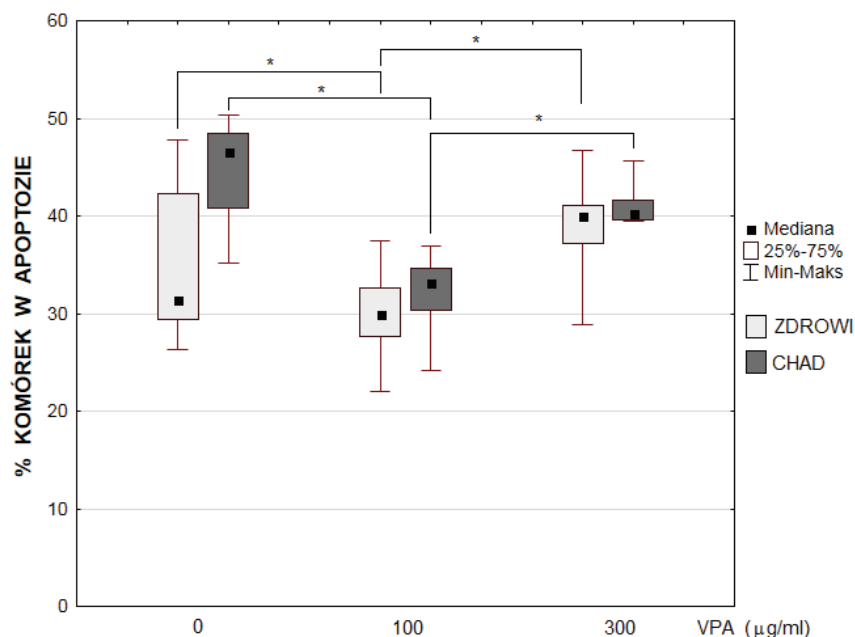
Rycina 84. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej kamptotecyną u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0, 100 lub 300 µg/ml). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



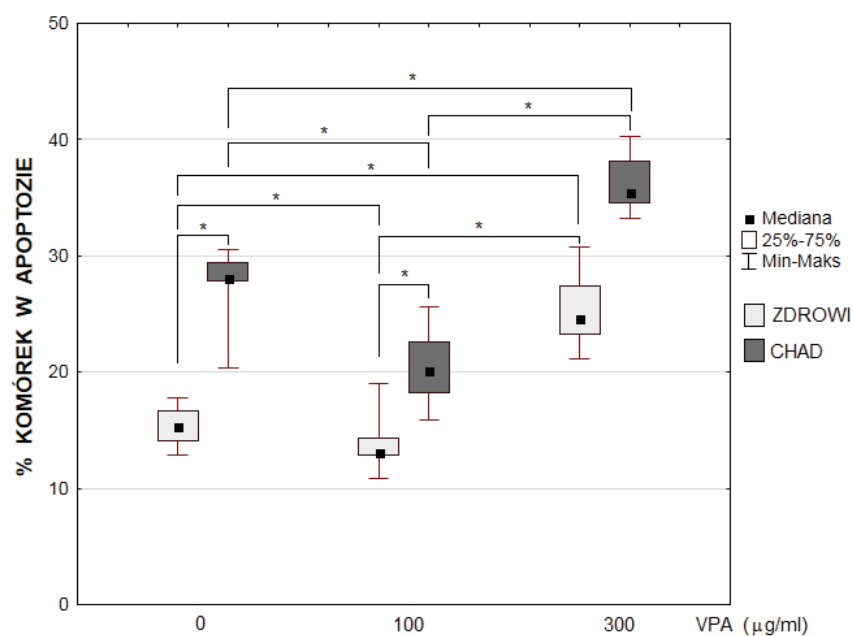
Rycina 85. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej nadtlakiem wodoru u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0, 100 lub 300 µg/ml). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



Rycina 86. Odsetek PBMC ulegających apoptozie indukowanej aktywacją u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0, 100 lub 300 µg/ml). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.



Rycina 87. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej kamptotecyną u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0, 100 lub 300 µg/ml). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.

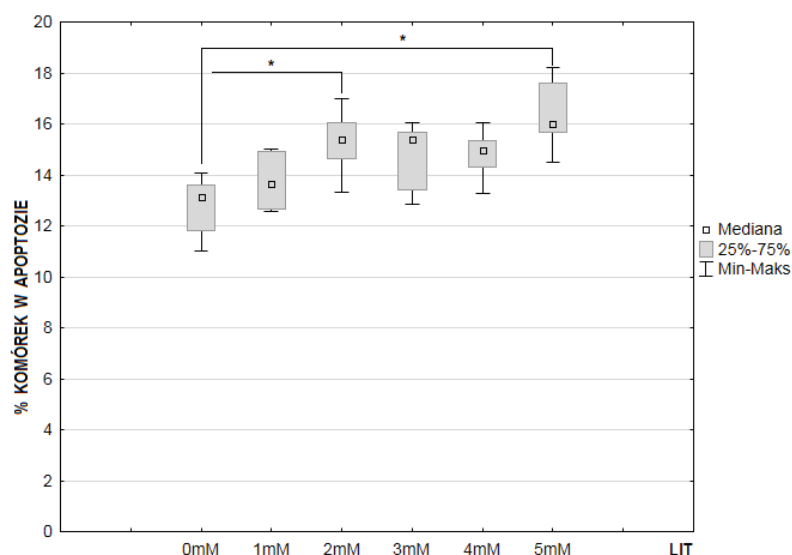


Rycina 88. Odsetek PBMC w apoptozie indukowanej nadtlakiem wodoru u osób zdrowych ($n_{\text{zdrowi}}=10$) oraz chorych na CHAD przyjmujących kwas walproinowy ($n_{\text{VPA}}=5$) w zależności od użytego stężenia kwasu walproinowego (0, 100 lub 300 µg/ml). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxon, * $p<0,05$.

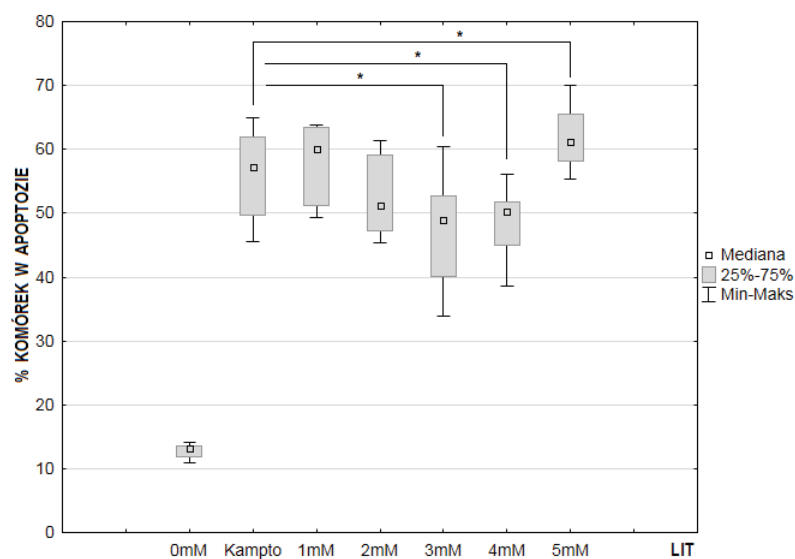
4.6. Ocena wpływu leków normotymicznych na apoptozę komórek linii MOLT-4.

Podobną ocenę wpływu leków normotymicznych wykonano z użyciem komórek linii MOLT4. I tak, barwienie z użyciem JC-1 wykazało, że węglan litu wykazuje znamienne istotne działanie proapoptotyczne na komórki MOLT-4 w stężeniach 2 i 5 mM (Rycina 89). Kamptotecyna istotnie zwiększa odsetek apoptotycznych komórek MOLT (Rycina 90). Sole litu w stężeniu 3-5 mM obniżają odsetek komórek apoptotycznych jednak nie do poziomu obserwowanego przy braku kamptotecyny w hodowli (Rycina 90). Nadtlenek wodoru również zwiększa odsetek apoptotycznych komórek MOLT (Rycina 91). Węglan litu zmniejsza odsetek komórek apoptotycznych w stężeniach 1-4 mM (Rycina 91).

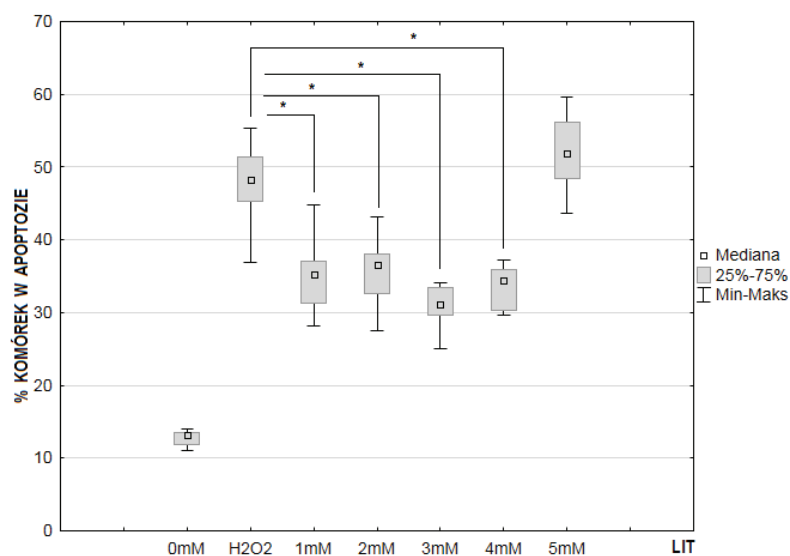
Z kolei, barwienie z użyciem aneksyny V wykazało, że węglan litu w stężeniach 1-4 mM znamienne zmniejsza odsetek apoptotycznych komórek MOLT-4 (Rycina 92). Kamptotecyna istotnie zwiększa odsetek komórek apoptotycznych a obecność węglanu litu w stężeniach 1 i 2 mM redukuje ten efekt (Rycina 93). Natomiast w obecności nadtlenu wodoru węglan litu w stężeniach 4 i 5 mM bardziej zwiększa odsetek komórek apoptotycznych (Rycina 94).



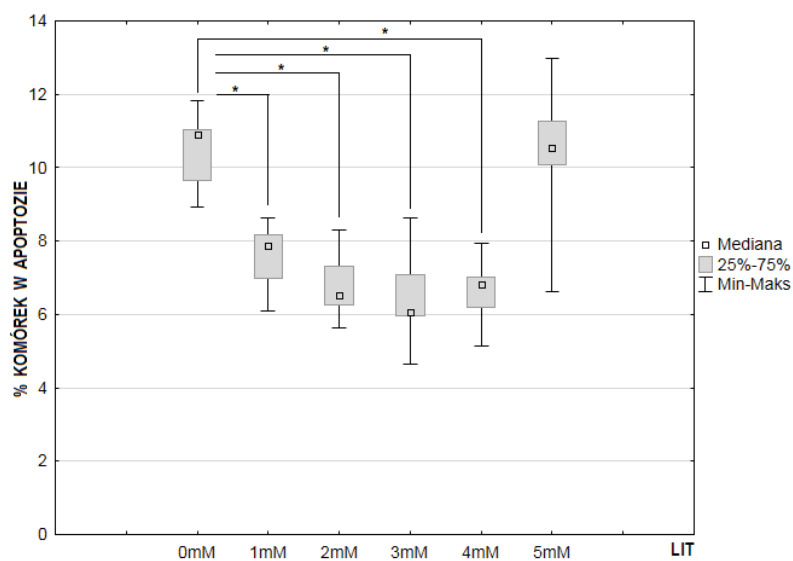
Rycina 89. Odsetek apoptotycznych komórek MOLT-4 w obecności różnych stężeń węglanu litu (0-5 mM). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxon, * $p < 0,05$.



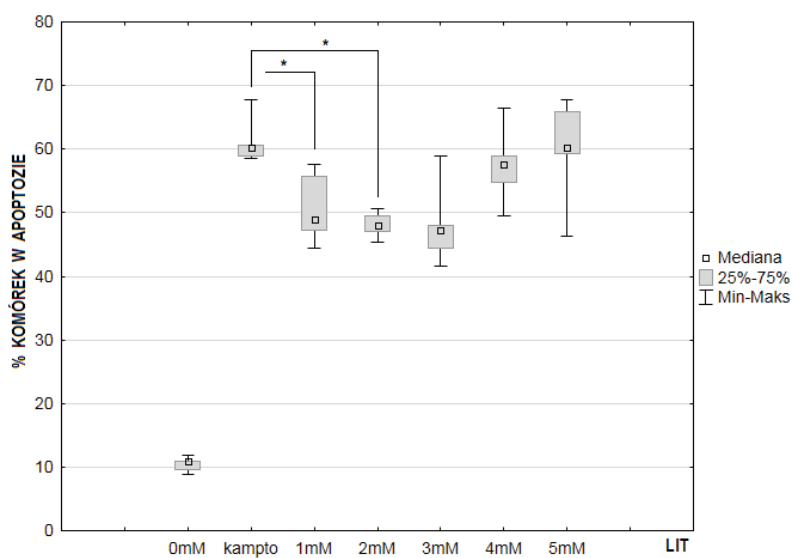
Rycina 90. Odsetek komórek MOLT-4 w apoptozie indukowanej kamptotecyną w obecności różnych stężeń węglańu litu (0-5 mM). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcozona, * $p < 0,05$.



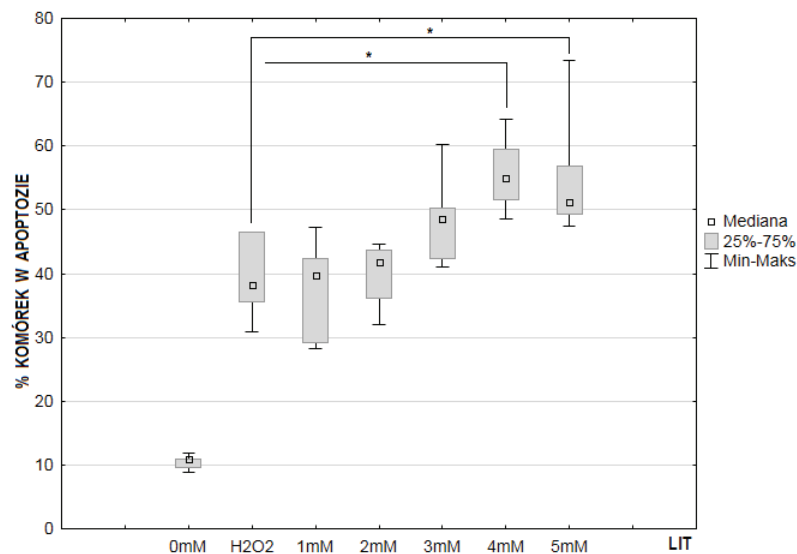
Rycina 91. Odsetek komórek MOLT-4 w apoptozie indukowanej nadtleniem wodoru w obecności różnych stężeń węglańu litu (0-5 mM). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcozona, * $p < 0,05$.



Rycina 92. Odsetek apoptotycznych komórek MOLT-4 w obecności różnych stężeń węglanu litu (0-5 mM). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxona, * $p < 0,05$.



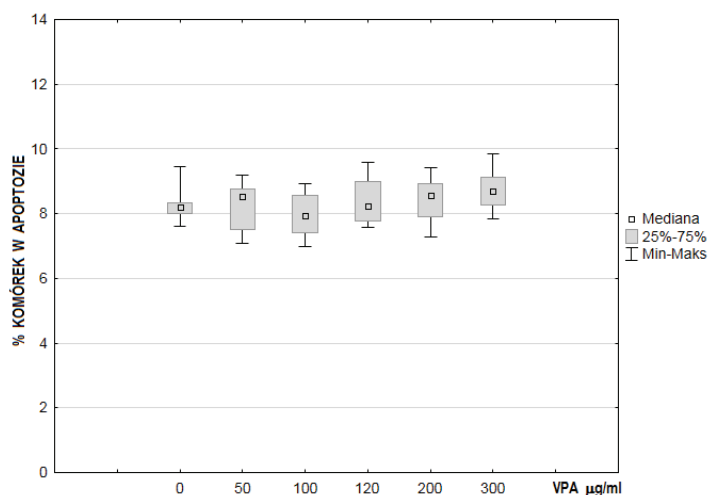
Rycina 93. Odsetek komórek MOLT-4 w apoptozie indukowanej kamptotecyną w obecności różnych stężeń węglanu litu (0-5 mM). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxona, * $p < 0,05$.



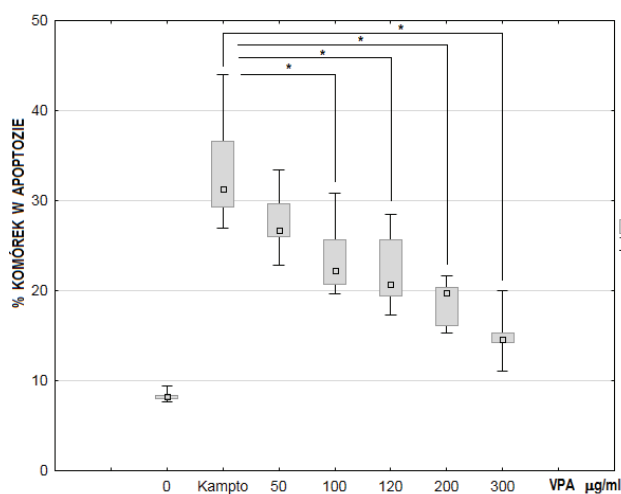
Rycina 94. Odsetek komórek MOLT-4 w apoptozie indukowanej nadtlaniem wodoru w obecności różnych stężeń węglanu litu (0-5 mM). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxon, * $p < 0,05$.

Barwienie z użyciem JC-1 wykazało, że kwas walproinowy w stężeniach 50-300 $\mu\text{g/ml}$ nie zmienia odsetka apoptotycznych komórek MOLT-4 (Rycina 95). W obecności kamptotecyny kwas walproinowy zmniejszał odsetek komórek apoptotycznych; im większe stężenie kwasu, tym większy spadek jest obserwowany (Rycina 96). W obecności nadtlenu wodoru kwas walproinowy również istotnie zmniejsza odsetek komórek apoptotycznych (Rycina 97).

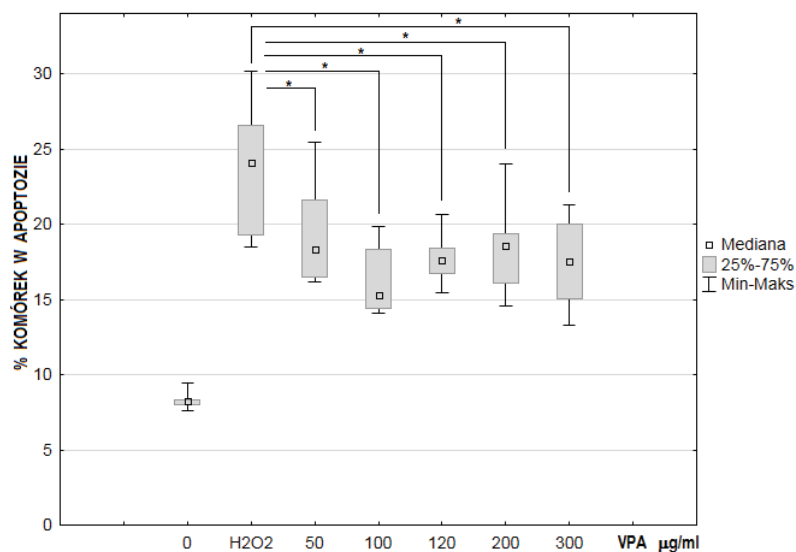
Z kolei, zastosowanie aneksyny V wykazało wzrost odsetka apoptotycznych komórek MOLT-4 wprost proporcjonalny do zastosowanego stężenia kwasu walproinowego (Rycina 98). Kwas walproinowy zmniejszał odsetek komórek apoptotycznych w hodowlach poddanych działaniu kamptotecyny w sposób zależny od stężenia VPA (Rycina 99). Z kolei w obecności nadtlenu wodoru kwas walproinowy znacząco zwiększał odsetek komórek apoptotycznych (Rycina 100).



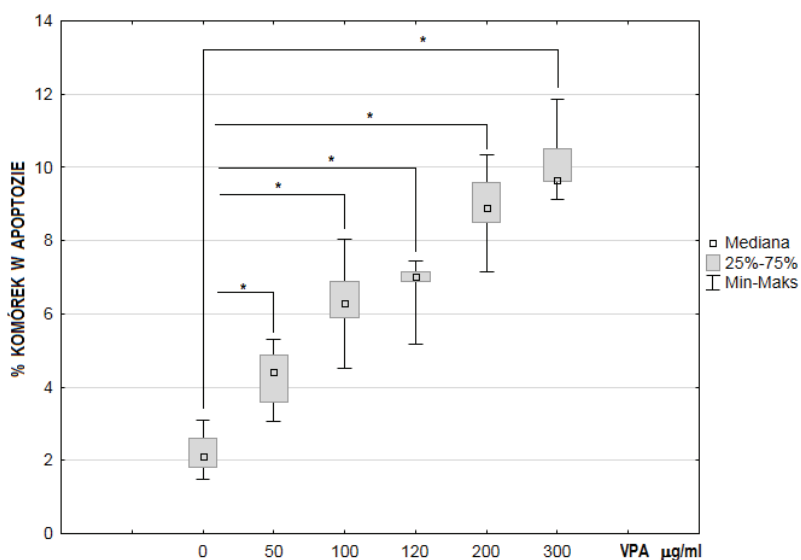
Rycina 95. Odsetek apoptotycznych komórek MOLT-4 w obecności różnych stężeń kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxona.



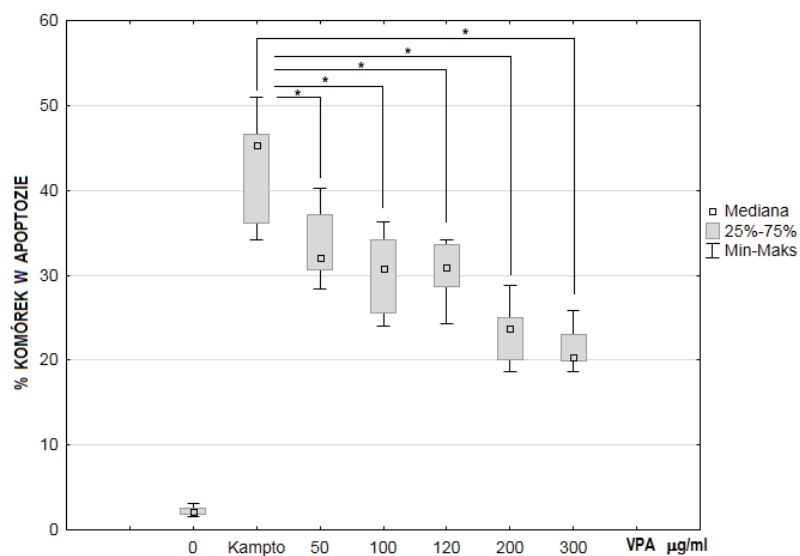
Rycina 96. Odsetek komórek MOLT-4 w apoptozie indukowanej kamptotecyną w obecności różnych stężeń kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxona, * $p < 0,05$.



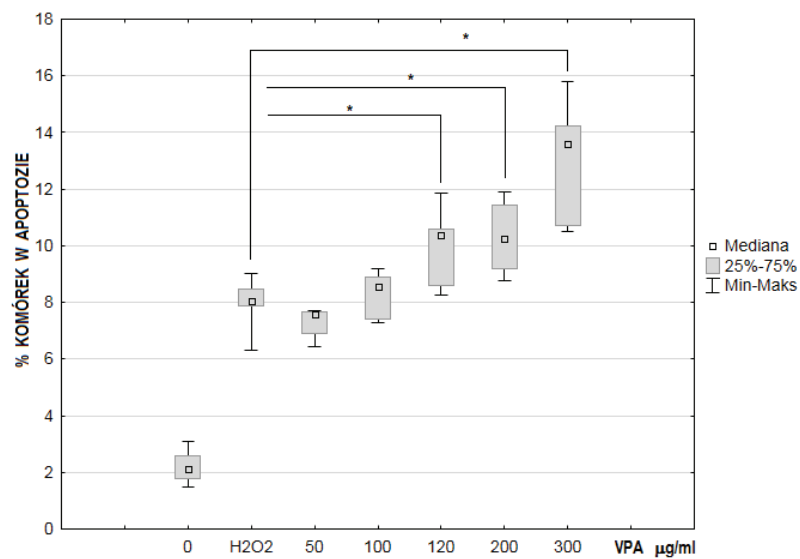
Rycina 97. Odsetek komórek MOLT-4 w apoptozie indukowanej nadtlaniem wodoru w obecności różnych stężeń kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem JC-1; test kolejności par Wilcoxon, * $p < 0,05$.



Rycina 98. Odsetek apoptotycznych komórek MOLT-4 w obecności różnych stężeń kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxon, * $p < 0,05$.



Rycina 99. Odsetek komórek MOLT-4 w apoptozie indukowanej kamptotecyną w obecności różnych stężeń kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxona, * $p < 0,05$.



Rycina 100. Odsetek komórek MOLT-4 w apoptozie indukowanej nadtlutkiem wodoru w obecności różnych stężeń kwasu walproinowego (0-300 $\mu\text{g/ml}$). Barwienie z użyciem aneksyny V; test kolejności par Wilcoxona, * $p < 0,05$.

5. DYSKUSJA

Psychoneuroimmunologia już od około trzydziestu lat bada powiązania pomiędzy mózgiem, zachowaniem a układem immunologicznym. Różne badania epidemiologiczne pokazują, że zarówno stres psychologiczny jak i występowanie depresji czy innych chorób psychicznych wiąże się ze zwiększoną zachorowalnością na niektóre choroby somatyczne i co za tym idzie ze zwiększoną śmiertelnością [96]. Do najczęstszych chorób towarzyszących należą: nowotwory, cukrzyca typu 2, choroby układu krążenia, układu oddechowego czy choroby neurologiczne [30, 96]. Stwierdzono również, że pod wpływem silnego stresora, jakim może być na przykład żałoba po stracie bliskiej osoby, może dochodzić do spadku odpowiedzi komórkowej limfocytów aktywowanych mitogenem oraz redukcji aktywności komórek NK [30].

Jedną z głównych teorii psychoneuroimmunologii jest zdolność do wzajemnego „porozumiewania się” układu nerwowego i immunologicznego a co za tym idzie możliwość wywierania wpływu przez stan psychiki na funkcje układu odpornościowego i odwrotnie. Komórki układu odpornościowego wpływają na działanie układu nerwowego między innymi poprzez produkcję cytokin, które mogą wpływać na funkcjonowanie komórek mózgu, na funkcjonowanie osi HPA oraz procesy behawioralne [33]. Jest to związane chociażby z obecnością receptorów dla IL-1 w neuronach podwzgórza i hipokampa [97]. Jako przykład wpływu cytokin na zachowanie może tu posłużyć terapia interferonem, który jest stosowany między innymi w leczeniu chorób wirusowych, np. wirusowego zapalenia wątroby typu C. Jednym z powikłań leczenia interferonem, może być między innymi depresja, upośledzenie funkcji poznawczych czy zaburzenia uwagi [98]. Tłumaczy się to wpływem $INF-\alpha$ na układ serotonergiczny poprzez oddziaływanie na metabolizm tryptofanu. Spadek poziomu tryptofanu jest spowodowany wzrostem jego katabolizmu do kinureiny. Sugeruje się również, że wywołane objawy depresyjne wynikają ze spadku stężenia serotoniny na obwodzie i w mózgu co jest prawdopodobnie związane ze zmianami w transkrypcji transportera 5-HT i nasileniem wychwytu zwrotnego serotoniny [51, 98]. Jak zostało wspomniane we Wstępie narządy limfatyczne są unerwione, co prowadzi do tworzenia się połączeń przypominających synapsy pomiędzy komórkami układu immunologicznego a zakończeniami nerwowymi, które uwalniają do przestrzeni synapsy różne chemiczne mediatory dla których komórki odpornościowe mają na swojej powierzchni receptory [33]. Jako przykłady efektów działania układu nerwowego na immunologiczny można wymienić: nasilenie migracji, chemotaksji i fagocytozy oraz proliferacji przez substancję P [33]; hamowanie proliferacji limfocytów T przez GABA [41]; hamowanie proliferacji i wpływ na dojrzewanie tymocytów przez NA; wzrost wytwarzania cytokin typu humoralnego jak np. IL-10 [99]. Najlepiej przebadanym, przykładem, kontroli sprawowanej przez mózg (także przez zachodzące w

mózgu procesy behawioralne) nad układem immunologicznym i jego odpowiedziami na zmiany biologiczne w układzie nerwowym i endokrynnym jest szeroko pojęty stres. Jednym z przykładowych badań nad wpływem stresu na układ odpornościowy jest badanie studentów podczas sesji egzaminacyjnej. W badaniach tych zaobserwowano spadek aktywności komórek NK, zmniejszenie odsetka limfocytów T_h , oraz spadek wytwarzania interferonu [33]. Układ immunologiczny jest bardzo wrażliwy na stres psychologiczny. Zmiany w jego funkcjonowaniu pod wpływem takiego stresu ujawniają się najczęściej w postaci immunosupresji. Zwiększa się wtedy podatność organizmu na różne choroby w tym głównie infekcyjne, bakteryjne, alergiczne, autoimmunologiczne i nowotworowe [33, 60].

Prace te potwierdzają, że istnieje ścisły związek pomiędzy układem nerwowym a immunologicznym. Pokazują również, stan psychiczny pacjenta może mieć swoje odzwierciedlenie w funkcjonowaniu układu odpornościowego.

Jak wynika z danych literaturowych coraz częściej zaburzenia nastroju jak depresja czy choroba afektywna dwubiegunowa rozpatrywane są pod kątem udziału procesów a nawet chorób zapalnych. Odkrywane są wzajemne interakcje pomiędzy procesem zapalnym a zaburzeniami nastroju. Dlatego też włączenie środków przeciwzapalnych do leczenia tych chorób psychicznych wydaje się być obiecujące [100].

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają związek aktywacji układu immunologicznego z obecnością choroby afektywnej dwubiegunowej. Przy porównaniach oznaczanych fenotypów: $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD197^+$, $CD4^+CD154^+$, $CD8^+CD154^+$ oraz indeksu $CD4^+/CD8^+$ byli brani pod uwagę wszyscy chorzy na CHAD, jak również poszczególne grupy wyłonione po podziale ze względu na przyjmowany lek jak i ze względu na fazę choroby. Badania wykazały, że odsetek limfocytów pomocniczych jest wyższy u osób z CHAD w fazie depresyjnej w porównaniu ze zdrowymi. Z kolei odsetek limfocytów cytotoksycznych jest zdecydowanie niższy u pacjentów bez względu na fazę choroby czy stosowane leczenie. To z kolei powoduje istotne zwiększenie stosunku komórek $CD4^+$ do $CD8^+$ u osób chorych (we wszystkich badanych grupach) w porównaniu ze zdrową kontrolą.

Do antygenów uważanych za markery aktywacyjne, które w tej pracy były oznaczane, należą antygeny CD25, CD197 oraz CD154. Antygen CD25 jest podjednostką alfa receptora dla interleukiny 2 (IL-2R), który obecny jest między innymi na aktywowanych limfocytach T i B [101]. Jego rola polega przede wszystkim na nasileniu aktywności proliferacyjnej stymulowanego limfocytu [102, 103]. W pracy wykazano wzrost odsetka komórek $CD25^+$ wśród limfocytów $CD4^+$ u osób chorych na CHAD, w szczególności u pacjentów w fazie depresji. Z kolei pacjenci będący w remisji charakteryzowali się poziomem limfocytów o tym fenotypie porównywalnym do zdrowej kontroli, a zastosowane leczenie nie miało wpływu na ten parametr. Uzyskane wyniki potwierdzają nasze poprzednie obserwacje

wzrostu odsetka komórek CD25⁺ w populacji limfocytów u pacjentów chorujących na depresję [104]. Należy przy tym zwrócić uwagę na to, że antygen CD25 może być markerem aktywacji, ale w tej populacji znajduje się także grupa komórek regulatorowych, które mają za zadanie kontrolować nadmierną aktywację limfocytów T [105].

Do ekspresji markera aktywacji CD197 (CCR7) dochodzi na wielu komórkach układu immunologicznego, między innymi na limfocytach T i B naiwnych (dziewiczych), komórkach pamięci oraz dojrzałych komórkach dendrytycznych [106]. Jego ligandami są cząsteczki chemokin CCL19 i CCL21 znajdujące się między innymi na fibroblastach (komórkach siateczkowatych) oraz komórkach dendrytycznych [106, 107]. Jego rola polega między innymi na aktywacji limfocytów T i B, kontroli nad migracją komórek pamięci do węzłów chłonnych oraz stymulowaniu dojrzewania komórek dendrytycznych [107]. Prezentowane wyniki wykazały, że odsetek aktywnych limfocytów o fenotypie CD4⁺CD197⁺ wzrasta u chorych z remisją choroby w porównaniu zarówno do osób zdrowych jak i pacjentów znajdujących się w fazie depresyjnej. Prawdopodobnie może to mieć znaczenie w utrzymaniu homeostazy organizmu. Podobnie, jak w przypadku antygenu CD25 zastosowane leczenie nie miało wpływu na odsetek limfocytów o tym fenotypie.

Cząsteczka CD154 (CD40L) jest ligandem dla antygenu powierzchniowego CD40 znajdującego się na limfocytach B, który należy do receptorów rodziny czynnika martwicy nowotworu (TNF) [108]. Antygen ten występuje na wielu typach komórek, między innymi aktywowanych limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺, aktywowanych przez IL-2 komórkach NK, monocytach [108]. Odgrywa on kluczową rolę w aktywacji odpowiedzi typu humoralnego; interakcje pomiędzy cząsteczką CD154 a cząsteczką CD40 odgrywają kluczową rolę dla proliferacji i różnicowania limfocytów B, w powstawaniu komórek antygenowo-specyficznych, aktywacji komórek prezentujących antygen oraz pobudzaniu sekrecji cytokin (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) [108]. U pacjentów znajdujących się w fazie remisji dochodzi do wzrostu odsetka zarówno komórek o fenotypie CD4⁺CD154⁺ jak i CD8⁺CD154⁺ w porównaniu do zdrowych oraz chorych w depresji. Podobnie, jak w przypadku dwóch poprzednich markerów aktywacji limfocytów zastosowane leczenie nie miało wpływu na odsetek limfocytów o tym fenotypie [108]. Funkcje limfocytów B w chorobie afektywnej dwubiegunowej jak na razie nie zostały określone, wymagają dalszych badań, a w literaturze na razie brak konkretnych danych na ten temat.

Zahamowanie proliferacji limfocytów T może wynikać z wpływu neuroprzekazników takich jak na przykład noradrenalina. W literaturze brak jak dotychczas konkretnych danych na temat która subpopulacja limfocytów T wzrasta a która maleje w przebiegu CHAD. Prezentowane wyniki pokazują wyraźny spadek limfocytów CD8⁺ u chorych. Jednym głównych zadań limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ jest przy pomocy receptora TCR (T cell receptor) rozpoznawanie i niszczenie potencjalnych komórek nowotworowych [109]. Do substancji, które są zdolne do blokowania reakcji

cytotoksycznych zaliczamy między innymi IL-10 – ta cytokina i podobnego typu substancje wydzielane są przez guzy nowotworowe w ramach tak zwanej ucieczki spod nadzoru immunologicznego [109]. W przedstawionych tu badaniach pokazujemy, że CHAD towarzyszy również wzrost IL-10, co może wyjaśniać fakt redukcji odsetka komórek cytotoksycznych – limfocytów CD8+ i częstsze występowanie zarówno infekcji wirusowych jak i chorób nowotworowych u pacjentów z CHAD [60].

W literaturze spotykamy się z niewielką liczbą opracowań na temat fenotypu limfocytów T u osób chorych na CHAD i przede wszystkim dotyczą one pacjentów znajdujących się w fazie remisji. Wyniki badań różnych autorów nie zawsze się potwierdzają, czego przykładem są oznaczenia odsetka komórek regulatorowych CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (ang. *regulatory T cell*, Treg). Według badań Drexhage i wsp. z 2011 roku procent tych komórek nie ulega zmianie u chorych na CHAD. Jednak po podziale pacjentów i osób z grupy kontrolnej ze względu na wiek zaobserwowano, że u osób chorych poniżej 40 roku życia dochodzi do wzrostu odsetka limfocytów o tym fenotypie [110]. Z kolei Hartmann do Prado i wsp. w pracy z 2013 roku pokazuje, że odsetek komórek regulatorowych spada u osób z CHAD w porównaniu ze zdrowymi [111]. Pojedyncze prace w których badano markery aktywacji limfocytów T, wykazały wzrost odsetka komórek CD3⁺CD25⁺ oraz CD3⁺CD71⁺ bez zmian w odsetku komórek o fenotypie CD3⁺CD69⁺ u chorych w remisji [112]. Większość wyników tych badań oraz wyniki własne przemawiałyby jednak za występowaniem zjawiska aktywacji limfocytów T w przebiegu choroby afektywnej a brak zmian w subpopulacji CD3⁺CD69⁺ należałoby tłumaczyć faktem, iż jest to choroba przewlekła.

Wzrost odsetka komórek z antygenem aktywacyjnym CD154 może powodować aktywację i różnicowanie się limfocytów B, a co za tym idzie odpowiada za możliwe nasilenie odpowiedzi humoralnej [113]. Wzrost IL-10 oraz spadek odsetka limfocytów CD8+, który wykazano w pracy zdaje się to potwierdzać. CD154 ma też właściwości plejotropowe w odniesieniu do apoptozy, które zależą od rodzaju komórki, z którą wchodzi w interakcję [113].

We wszystkich cytowanych wyżej badaniach brali udział pacjenci z CHAD będący w fazie remisji. Tymczasem w prezentowanej pracy badaniem byli objęci nie tylko pacjenci w okresie remisji ale również w fazie depresyjnej, co pozwoliło zbadać zachowanie układu immunologicznego w zależności od aktualnej fazy CHAD. Uczestnicy badania zostali również lepiej dobrani pod kątem stosowanej terapii; były to osoby na monoterapii – chorzy przyjmowali albo węglan litu albo kwas walproinowy. Grupy badane w prezentowanych publikacjach były leczone całym dostępnym spektrum stosowanych w tej chorobie leków. Może to być przyczyną pewnych rozbieżności w badaniach. Oczywiście kwestia zmian w fenotypie limfocytów w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej nadal wymaga dalszych badań. Jednak z powyższych danych można wyciągnąć dwa główne wnioski. Po pierwsze, chorzy na CHAD charakteryzują się zmianami w fenotypie limfocytów T

wskazującymi na aktywację układu immunologicznego. Po drugie, zmiany te są charakterystyczne dla samej choroby a nie dla stosowanych w terapii leków i mogą być zależne od fazy choroby.

Liczba doniesień, w których badano poziomy cytokin u pacjentów chorych na CHAD wydaje się być większa i co za tym idzie zagadnienie to jest lepiej przebadane niż omawiane fenotypy limfocytów w tej chorobie. Pierwsze prace na temat cytokin w CHAD pojawiły się na początku XXI wieku. Jedną z pierwszych na ten temat jest badanie przeprowadzone przez naukowców z Grecji w 2004 [114]. Autorzy oznaczali stężenia INF- γ , IL-2, IL-6 oraz IL-10 zarówno w surowicy jak i w supernatantach po hodowli z mitogenem u pacjentów przed leczeniem litem jak i po 3 miesięcznej kuracji. Oznaczając te parametry metodą ELISA w surowicy otrzymali wartości nie mierzalne – zbyt niskie. Natomiast badanie poziom cytokin w supernatantach po hodowli limfocytów w obecności fitohemaglutyniny (PHA) metodą ELISPOT wykazało, że komórki pacjentów przed leczeniem litem charakteryzowały się nasiloną produkcją wymienionych wyżej cytokin, a po 3 miesiącach terapii poziom ten znacznie spadał, co było istotne statystycznie [114]. W innym doświadczeniu zaobserwowano u chorych w fazie maniakalnej w supernatantach po hodowli komórek w obecności mitogenu wzrost IL-6 oraz TNF- α przy jednoczesnym spadku IL-4 w porównaniu z osobami zdrowymi [115]. Autorzy nie wykazali różnic w poziomie IL-2 oraz INF- γ . Po sześciu tygodniach leczenia różnymi normotymikami (litem, VPA lub litem z VPA) dochodziło do spadku jedynie IL-6 [115]. Prace O'Brien i wsp. wykazały, że IL-6 wrasta w fazie maniakalnej, natomiast w fazie depresji pozostaje niezmienną [116]. Tymczasem poziom IL-8 oraz TNF- α wzrasta zarówno w depresji jak i manii, podczas gdy stężenie IL-10 pozostaje bez zmian w porównaniu ze zdrową kontrolą [116].

Wszystkie wymienione prace prezentują wyniki uzyskane metodą immunoenzymatyczną - ELISA. Obecnie coraz częściej sięga się do bardziej zaawansowanych metod, jakim jest na przykład oznaczanie poziomu cytokin przy użyciu cytometrycznej metody CBA (ang. *cytometric bead array*). Oznaczanie cytokin metodą CBA umożliwia jednoczesny pomiar do 6 białek w małej objętości materiału (50 μ l) co daje oszczędność zarówno próbki biologicznej jak i kosztów w porównaniu z testem ELISA [117, 118]. W pracy Ondigo z 2012 roku odnośnie standaryzacji metody CBA oraz porównania jej z metodą testów ELISA autor zwraca uwagę na większą dokładność i wiarygodność testu CBA [119]. Badania wykonywane przy użyciu CBA uznaje się za konkurencyjne do oznaczeń immunoenzymatycznych. Metoda CBA ma także szerszy zakres czułości pomiaru niż ELISA; w niektórych przypadkach CBA pozwala na wykrywanie cytokin w próbkach w których ich stężenie jest niewykrywalne dla testów ELISA [120]. Jedną z pierwszych prac stosujących metodę CBA do oznaczeń cytokin u osób chorych na CHAD ukazała się w 2009 roku. Badano w niej w surowicy pacjentów cytokiny takie jak: IL-2, IL-6, IL-4, IFN- γ , TNF- α , w których wykazano wzrost poziomu IL-2,

IL-4 i IL-6 u pacjentów w manii w porównaniu ze zdrową kontrolą [124]. Natomiast w fazie depresyjnej dochodziło do wzrostu IL-6, a w remisji zaobserwowano wzrost IL-4 [124]. W poziomach pozostałych cytokin (IL-10, INF- γ , TNF- α) autorzy nie zaobserwowali żadnych istotnych zmian [121]. Z kolei, Guloksuz i wsp. w 2010 wykazali, że u osób w trakcie terapii litem dochodzi do istotnego zwiększenia TNF- α w porównaniu do chorych nie leczonych związkami litu oraz zwiększa się poziom IL-4 w porównaniu do zdrowej kontroli [122].

Jak można zauważyć, brak jest spójnych danych na temat produkcji cytokin przez komórki układu immunologicznego w przebiegu CHAD. Wyniki przedstawiane w prezentowanej pracy częściowo potwierdzają wyniki niektórych autorów. Dotyczy to głównie IL-6, której poziom był wyższy u osób z CHAD w porównaniu z kontrolą, w szczególności w grupie pacjentów znajdujących się w fazie remisji. Ponadto, wykazano, że poziom IL-6 jest podwyższony u chorych leczonych węglanem litu. Z kolei poziom TNF nie ulegał żadnym istotnym zmianom w zależności od fazy choroby czy zastosowanego leczenia, co jest zgodne z obserwacjami Brietzke i wsp. [121]. Dane literaturowe przedstawiają różne wyniki prawdopodobnie w zależności od metody pomiaru i materiału w którym TNF był oznaczany.

Żadna z wymienionych prac nie wykazała wzrostu poziomu IL-10, cytokiny, która w prezentowanych wynikach jest znamienne podwyższona u chorych z CHAD zarówno w fazie depresyjnej, jak i w remisji bez względu na rodzaj przyjmowanego leku. IL-10 jest cytokiną o właściwościach anty-zapalnych, hamuje odpowiedź immunologiczną typu komórkowego przestawiając ją w kierunku humoralnym, co jest wynikiem jej zdolności do pobudzania wzrostu i różnicowania limfocytów B [35].

IL-17A jest produkowana przede wszystkim limfocyty Th17 a także limfocyty T $\gamma\delta$ i jej główna rola polega na promowaniu reakcji zapalnej głównie przez pobudzenie produkcji wielu różnych cytokin i chemokin, między innymi IL-6, IL-1 β , TGF- β , TNF- α czy IL-8 [56]. Poziom IL-17A, który był badany przez Hartman do Prado i wsp., był niższy u pacjentów z CHAD w remisji w porównaniu do grupy kontrolnej [111]. Prezentowane w pracy wyniki potwierdzają te dane; co więcej, pokazują iż niski poziom IL-17A dotyczy nie tylko fazy remisji ale również depresji.

Uzyskane wyniki sugerują, pośrednio że u chorych z CHAD istotną rolę może odgrywać odpowiedź humoralna związana głównie z aktywacją limfocytów B i produkcją przeciwciał. Po pierwsze, wszyscy pacjenci charakteryzują się niskim odsetkiem limfocytów CD8⁺, które odpowiedzialne są za odpowiedź typu komórkowego. Po drugie, limfocyty T pacjentów znajdujących się w fazie remisji charakteryzują się wzrostem odsetka komórek z antygenem CD154, który pełni istotną rolę w aktywacji odpowiedzi humoralnej indukując różnicowanie, proliferację i produkcję przeciwciał przez limfocyty B [113]. Co więcej, antygen ten jest też odpowiedzialny za pobudzenie

produkcji IL-6 i IL-10 [113], których podwyższony poziom stwierdzono u badanych chorych. Za przesunięciem odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi humoralnej może także świadczyć fakt, że u osób chorych na CHAD stwierdza się częstsze współwystępowanie chorób o podłożu autoimmunologicznym [123].

Konieczne są jednak dodatkowe badania takie jak oznaczenie stężenia przeciwciał immunoglobulin oraz ocena funkcji limfocytów B, dzięki którym można by było tą tezę potwierdzić.

W chwili obecnej brak jest konkretnych danych literaturowych dotyczących zdolności proliferacyjnych limfocytów T u chorych z CHAD tym bardziej z zastosowaniem metody DCT, która pozwala na dokładne oznaczenie kilku parametrów cyklu komórkowego jednocześnie [85]. Young i wsp. w swojej pracy pogładowej z 2009 roku odnośnie mechanizmu działania soli litu wspominają, że lek ten powoduje spadek liczby limfocytów T, ale równocześnie wzmacnia funkcje tych komórek [125]. Prezentowane badania wykazały, że parametry proliferacyjne limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$ chorych na CHAD różnią się w zależności od fazy choroby oraz stosowanego leku. Limfocyty T pacjentów charakteryzują się niższą liczbą podziałów przypadających na jedną komórkę; dotyczy to zwłaszcza limfocytów chorych znajdujących się w fazie depresji. Osłabioną odpowiedź proliferacyjną limfocytów opisywano już u chorych na depresję w latach 90-tych ubiegłego wieku [125, 126]. Może być to związane właśnie ze wzrostem odsetka komórek $CD4^+CD25^+$ obserwowanych zarówno u pacjentów z depresją [104], jak i u chorych na CHAD znajdujących się w fazie depresji, co zademonstrowaliśmy w tej pracy.

Obie populacje limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$ chorych z CHAD charakteryzują się też dłuższym cyklem komórkowym w porównaniu do osób zdrowych; dotyczy to zwłaszcza chorych leczonych kwasem walproinowym. Jest to o tyle istotne, że im dłużej trwa cykl komórkowy danej komórki, tym mniejsza jest efektywność proliferacyjna danej populacji, co może mieć odzwierciedlenie, na przykład, w ilości wykonanych podziałów komórkowych, a w konsekwencji w ostatecznej liczbie komórek efektorowych. Ponieważ funkcje komórek mikrogleju związane są między innymi z monitorowaniem stanu mikrośrodowiska komórek OUN i aktywacja mikrogleju wiąże się ze wzrostem poziomu czynników pełniących funkcje immunologiczne możemy doszukiwać się pewnych analogii w zachowaniu się mikrogleju i komórek układu odpornościowego [127]. W roku 2009 Orre i wsp. wykazali, że przewlekłe leczenie węglanem litu prowadzi do zmniejszenia szybkości proliferacji komórek glejowych [128]. Ponieważ wiele z procesów biologicznych zachodzących w mózgu przy chorobach natury psychicznej ma swoje odzwierciedlenie we właściwościach komórek PBMC, można pokusić się o stwierdzenie, że wyniki opublikowane przez Orre i wsp. oraz wyniki prezentowane w tej pracy wzajemnie się potwierdzają. Dotyczy to oczywiście jedynie efektów leczenia litem. Co do właściwości kwasu walproinowego i jego zdolności do zmniejszania liczby podziałów komórkowych

oraz wydłużania cyklu komórkowego limfocytów czy jakichkolwiek innych komórek, jest to prawdopodobnie konsekwencją hamowania działania deacetylazy histonowej (HDAC), co prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1/S a w wyższych stężeniach także w fazie G2/M [29]. Natomiast mechanizm działania litu na cykl komórkowy do tej pory nie jest poznany.

Doświadczenia *in vitro*, w których inkubowano PBMC pacjentów oraz osób zdrowych z różnymi stężeniami badanych normotymików, potwierdzają część z tych obserwacji, np. spadek liczby podziałów czy wydłużenie cyklu komórkowego pod wpływem kwasu walproinowego. Jednak zdarzały się też pewne rozbieżności, jak choćby w przypadku działania litu na liczbę podziałów komórkowych czy długość cyklu komórkowego limfocytów u osób zdrowych i pacjentów, zwłaszcza w obecności dużej dawki, ale także w obecności dawki odpowiadającej stężeniu terapeutycznemu osiąganemu we krwi u pacjenta. Również kwas walproinowy w dawce znacząco przekraczającej wartości terapeutyczne zmniejszał znacząco odsetek proliferujących komórek CD4⁺. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że w hodowli komórkowej lit, ale też kwas walproinowy działa jedynie na same PBMC, podczas gdy we krwi, poza komórkami układu odpornościowego, leki te rozkładają swoje działanie również na inne komórki.

O ile, limfocyty CD4⁺ chorych na CHAD, zwłaszcza tych leczonych węglanem litu, charakteryzowały się niższym współczynnikiem proliferacji, to współczynnik proliferacji limfocytów CD8⁺ pacjentów z depresją bądź leczonych litem lub kwasem walproinowym był zdecydowanie wyższy niż u osób zdrowych. Mogłoby być to wynikiem efektu kompensacyjnego, tzn. przy spadku odsetka proliferujących komórek CD4⁺, limfocyty CD8⁺ dzielą się bardziej intensywnie, aby utrzymać homeostazę układu immunologicznego, co było już opisywane w literaturze [129]. Jednocześnie nie obserwujemy wzrostu odsetka proliferujących komórek CD8⁺ u tych chorych. W związku z tym bardziej prawdopodobne jest, że wzrost współczynnika proliferacji jest konsekwencją cytoprotekcyjnego działania litu lub kwasu walproinowego. Potwierdzają to badania apoptozy PBMC *in vitro*, w których wykazano, że lit oraz kwas walproinowy zmniejszają odsetek komórek apoptotycznych w zakresie dawek terapeutycznych, co wykazano u osób zdrowych. Co więcej, wydaje się, że lit działa wybiórczo na limfocyty CD8⁺, ponieważ współczynnik proliferacji limfocytów CD4⁺ był u chorych leczonych tym lekiem zdecydowanie niższy; przy tym wyjściowo odsetek komórek apoptotycznych u chorych CHAD był na podobnym poziomie jak u osób zdrowych bądź wyższy w zależności od użytego czynnika indukującego śmierć komórkową, ale ponieważ apoptoza była badana w całej populacji PBMC, nie jesteśmy w stanie potwierdzić tej tezy.

Apoptoza limfocytów T w przebiegu CHAD i wpływ leków normotymicznych na ten proces to kolejne zagadnienie, które wymaga dalszych badań. Dane literaturowe raczej skąpo wypowiadają się

na ten temat, choć wydawałoby się, że proces apoptozy jest już dość przebadany. Jak się jednak okazuje nie w kontekście CHAD; opublikowano do tej pory zaledwie dwie publikacje omawiające szczegółowo ten temat. Bei i wsp. w 2009 roku opisali swoje badania procesu apoptozy limfocytów w przebiegu CHAD, nie poprzez bezpośrednie oznaczanie odsetka komórek apoptotycznych, ale pośrednio poprzez wykazanie wzrostu poziomu cytochromu c w cytoplazmie i translokację białka Bax [87]. Natomiast w najnowszej pracy z roku 2014 autorzy badali proporcje PBMC pacjentów znajdujących się w fazie remisji i zaobserwowali oni wzrost odsetka komórek we wczesnej apoptozie u chorych z CHAD w porównaniu do zdrowej kontroli [84]. Autorzy jako metodę badawczą zastosowali barwienie aneksyną V oraz PI; za wczesną apoptozę przyjęli komórki aneksyna(+)/PI(-), za późną apoptozę – aneksyna(+)/PI(+) [84]. W prezentowanej pracy wczesna apoptoza była oznaczana głównie poprzez ocenę zmiany potencjału mitochondrialnego w komórce. Barwienie aneksyną V jako metoda do oceny wczesnej apoptozy jest przy obecnych możliwościach badawczych bardzo zgrubne, gdyż mówi ono już o procesach zachodzących w błonie komórkowej, podczas gdy barwienie z użyciem JC-1 mówi nam o zmianach w potencjale mitochondrialnym, które to zmiany są obecnie uważane za pierwsze oznaki zachodzącego procesu apoptozy [130]. Zastosowanie różnych schematów doświadczalnych (autorzy wymienionych prac nie stymulowali komórek), metod badawczych oraz wybór różnych grup pacjentów nie pozwala na dobre porównanie uzyskanych w pracy wyników. Generalnie, wydaje się, że PBMC chorych z CHAD, zarówno leczonych węglanem litu, jak i kwasem walproinowym, zdecydowanie w większej ilości ulegają apoptozie indukowanej bądź samą aktywacją, bądź czynnikiem stymulującym śmierć komórkową, co wykazano stosując zarówno barwienie z użyciem JC-1 jak i aneksyny V. Oba leki wykazują działanie cytoprotekcyjne *in vitro*, ale głównie w dawkach zbliżonych do terapeutycznych. W dawce znacznie przekraczające zalecane stężenie, oba leki nie zmniejszają odsetka komórek apoptotycznych, a nawet działają proapoptotycznie.

Podsumowując, oba leki działają hamująco na cykl komórkowy zarówno limfocytów CD4⁺ jak i CD8⁺, przy czym mechanizm działania węglanu litu w dalszym ciągu nie jest dokładnie poznany. Natomiast oba leki wykazują działanie cytoprotekcyjne względem PBMC głównie w dawkach terapeutycznych. W dawkach przekraczających dawki terapeutyczne, co zwłaszcza dobrze widać na przykładzie działania kwasu walproinowego, mogą mocniej hamować cykl komórkowy oraz działać nawet proapoptotycznie, zwłaszcza w obecności nadtlenu wodoru.

Przedstawione badania, w których wykorzystano pochodzącą z limfocytów T białaczkową linię MOLT-4 wydają się wskazywać na uniwersalny mechanizm działania normotymików na limfocyty. Linia komórkowa MOLT-4, która została użyta jako model limfocyta T była badana pod kątem przebiegu procesu apoptozy w obecności badanych leków. Zarówno lit jak i kwas walproinowy w

metodzie barwienia JC-1 wydają się być cytoprotekcyjne w przypadku apoptozy indukowanej samą aktywacją jak również w obecności czynników proapoptotycznych głównie w stężeniach terapeutycznych leków. Zgodnie z powszechnie przyjętym schematem apoptozy pierwsze zmiany apoptotyczne powinny być obserwowane w mitochondriach (obniżenie się potencjału błonowego) następnie w miarę trwania procesu dochodzi do zmian w błonie komórkowej (zaburzenie asymetrycznego rozmieszczenia fosfatydyloseryny). Niestety schemat ten nie zawsze potwierdza się w przedstawionych badaniach. Nie jest to jednak odosobniony przypadek. W literaturze możemy spotkać się z doniesieniem z 2000 roku (Denecker i wsp.) gdzie w badaniach procesu apoptozy na dwóch liniach komórkowych podczas równoczesnego oznaczania utraty potencjału błonowego mitochondrium oraz przemieszczania się fosfatydyloseryny (PS) do warstwy zewnętrznej błony komórkowej zaobserwowali że kolejność zdarzeń w procesie apoptozy był odwrotny [131].

Wydaje się że zjawisko to można jednak wytłumaczyć. Apoptoza może przebiegać tzw. szlakiem indukowanym stresem. W szlaku tym dochodzi do zaburzenia homeostazy wapnia oraz biorą w nim udział retikulum endoplazmatyczne oraz kaspaza 12 [68]. Jony wapnia mogą stać się kluczowym elementem wyjaśnienia tej obserwacji, wykazano bowiem, że biorą one pośredni udział w eksternalizacji PS. Białko skramblaza uczestniczące w transporcie PS jest aktywowane właśnie przez jony wapnia [132]. Równocześnie należy zaznaczyć, że jak pokazują badania płytki krwi i limfocyty osób z CHAD typu I charakteryzują się zwiększonym poziomem wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, a leczenie litem moduluje jego poziom [133].

Podsumowując przedstawione wyniki, pacjenci z CHAD charakteryzują się istotnymi zmianami w odsetku podstawowych populacji limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$ ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji antygenów aktywacyjnych na ich powierzchni w porównaniu do osoby zdrowej. Ponadto, zmiany te są związane przede wszystkim z fazą choroby, w której aktualnie znajdują się pacjenci, podczas gdy zastosowane leczenie wydaje się nie mieć wpływu na status aktywacji limfocytów T. Natomiast, zwiększony odsetek komórek z antygenem CD154 oraz a także profil cytokin chorych z CHAD sugeruje, że w tej chorobie dominującą rolę może odgrywać odpowiedź humoralna związana głównie z aktywacją limfocytów B i produkcją przeciwciał.

Stosowane w leczeniu CHAD leki normotymiczne, w szczególności węglan litu i kwas walproinowy, których działanie było badane w prezentowanej pracy, wykazują istotne działanie cytoprotekcyjne na komórki jednojądrzaste pacjentów, ale jednocześnie działają hamująco na proliferację zarówno limfocytów $CD4^+$, jak i $CD8^+$, przy czym ich działanie w dużej mierze jest zależne od zastosowanej dawki.

6. WNIOSKI

- Limfocyty T osób chorych na CHAD wykazują fenotyp aktywacyjny. Zmiany w fenotypie wydają się być charakterystyczne dla choroby i zależne od jej aktualnej fazy. Zmiany w fenotypie nie są zależne od stosowanych normotymików.
- Poziomy badanych cytokin: IL-17A, IL-10, IL-6, TNF- α , wskazują na przewlekły stan zapalny towarzyszący CHAD, co wydaje się charakterystyczne dla choroby a nie dla zastosowanej terapii. Uzyskane wyniki sugerują przesunięcie odpowiedzi immunologicznej chorych w kierunku odpowiedzi Th2.
- U chorych na CHAD obserwowane są zmiany dynamiki proliferacji limfocytów CD4+ jak i CD8+ zależne od terapii i mogące wpływać na efektywność odpowiedzi immunologicznej.
- Limfocyty osób chorych na CHAD charakteryzują się większą wrażliwością na czynniki wywołujące apoptozę niż obserwujemy to u zdrowej kontroli. Badane leki normotymiczne w stężeniach terapeutycznych wykazują działanie cytoprotekcyjne.

7. LITERATURA

- [1] Lewandowska A, Rybakowski J. *Neuropsychologiczne aspekty zespołu maniakalnego w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej*. Psychiatria Polska 2009 (3); 275-286.
- [2] Bilikiewicz A, Landowski J, Radziwiłłowicz P. *Psychiatria repetytorium*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 2003.
- [3] Bauer M, Pfennig A. *Epidemiology of bipolar disorders*. Epilepsia 2005, 40, 8-13.
- [4] Price AL, Marzani-Nissen GR. *Bipolar Disorders: A Review*. Am Fam Physician 2012 Mar1;85(5):483-493.
- [5] Simon GE. *Social and economic burden of mood disorders*. Biol Psychiatry 2003;54:208-215.
- [6] Patel A. *The cost of mood disorders*. Psychiatry 2008; 8(2), 76-80.
- [7] Sachs GS, Thase ME. *Zaburzenia afektywne dwubiegunowe*. Medical Press, Gdańsk 2003.
- [8] Walden J, Grunze H. *Choroba afektywna dwubiegunowa. Etiologia i leczenie*. Urban&Partner Wrocław 2000.
- [9] *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, wyd 4. Copyright 1994, American Psychiatric Association.
- [10] Rybakowski J, Dudek D. *Standardy farmakologicznego leczenia chorób afektywnych*. Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii. 2011; 3-4, 135-157.
- [11] Schou M. *Lithium Treatment of Mood Disorders, a practical guide* 6th revised edition, Karger 2004.
- [12] Shaldubina A, Agam G, Belmaker R.H. *The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later*. Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiatry 2001; 25: 855-866.
- [13] Chen RW, Chuang DM. *Long-term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increase Bcl-2 expresion*. J Biol Chem 1999; 274, 6039-6042.
- [14] Chuang DM, Wang Z, Chiu ChT. *GSK-3 as a target for lithium-induced neuroprotection against excitotoxicity in neuronal cultures and animal models of ischemic stroke*. Frontiers in Molecular Neuroscience 2011;4(15): 1-12
- [15] Harwood AJ. *Lithium and bipolar mood disorder: the inositol – depletion hypothesis revisited*. Molecular Psychiatry 2005, 10, 117-126.
- [16] Gawlik O, Rabe-Jabłońska J. *Mechanizmy działania jonów litu w ośrodkowym układzie nerwowym*. Psychiatr Psychol Klin 2008, 8(4), 211-217.
- [17] Lenox RH, Wang Le. *Molecular basis of lithium action: integration of lithium responsive signaling and gene expression networks*. Molecular Psychiatry 2003, 8: 135-144.
- [18] Salinas PC, Hall AC. *Lithium and synaptic plasticity*. Bipolar Disor 1999;2:87-90.
- [19] Olie JP, Costa de Silva JA, Macher JP. *Neuroplastyczność. Patofizjologia depresji w nowym ujęciu*. Via Medica Gdańsk 2004.
- [20] Motohashi N. *GABA receptor alterations after chronic lithium administration. Comparison with carbamazepine and sodium valproate*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1992 Jul;16(4):571-9.

- [21] Shaldubina A, Agam G, Belmaker RH. *The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2001; 25(4):855–866.
- [22] Corbella B, Vieta E. *Molecular targets of lithium action*. Acta Neuropsychiatrica 2003;15:316-340.
- [23] Masana MI, Britran JA, Hsiao JK, Potter WZ. In vitro evidence that lithium inactivates G, modulation of adenylate cyclase in brain. J Neurochem 1992;59(1):200-205.
- [24] Fagundes SBR. *Valproic Acid: Review*. Rev Neuroscienc 2008;16(2):130-136.
- [25] Chateavieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. *Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid*. J Biomed Biotechnol. 2010;1-18.
- [26] Grunze H, Walden J. *Kwas walproinowy w zaburzeniach afektywnych dwubiegunowych*. Urban&Partner Wrocław 2002.
- [27] Longstaff A. *Neurobiologia. Krótkie wykłady*. Wydawnictwo Naukowe PWN; Warszawa 2005.
- [28] Coyle JT, Manji HK. Getting balance: Drug for Bipolar disorder share target. Nature Medicine 2002; 8(6):557-558.
- [29] Grabarska A, Dmoszyńska-Graniczka M, Nowosadzka E, Stepulak A. *Inhibitory deacetylaz histonów – mechanizmy działania na poziomie molekularnym i zastosowania kliniczne*. Postepy Hig Med Dosw 2013; 67: 722-735.
- [30] Irwin MR. *Human psychoneuroimmunology: 20 Year of discovery*. Brain, Behavior, and Immunity 2008; 22: 129-139.
- [31] Webster J, Toelli L, Sternberg EM. *Neuroendocrine regulation of immunity*. Annual Review of Immunology 2002(20); 125-163.
- [32] Pietruczuk K, Jakuszkowiak K, Nowicki Z, Witkowski JM. *Cytokiny w regulacji snu i jego zaburzeniach*. Sen 2003; 3(4):127-133.
- [33] Lutz W, Tarkowski M, Dudek B. *Psychoimmunologia. Nowe spojrzenie na funkcjonowanie układu odpornościowego*. Medycyna Pracy 2001; 52(3):203-209.
- [34] Kohm AP, Sanders VM. *Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo*. Pharmacol Rev. 2001 Dec;53(4):487-525.
- [35] Jakóbiński M. *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2000; rozdział 24; 387-399.
- [36] Zhang JH, Hu CW, Zhu YZ, Liu SM, Bai CS, Han YF, Xia SL, Li YF. *Effects of norepinephrine on immune function of cultured splenic lymphocytes exposed to aluminium trichloride*. Biol Trace Elem Res 2013; 15(2); 275-280.
- [37] Kohm AP, Sanders VM. *Norepinephrine and β_2 -adrenergic receptor stimulation regulate CD4⁺ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo*. Pharmacol Rev 2001; 53(4): 487-525.
- [38] Strell C, Sievers A, Bastian P, Lang K, Niggemann B, Zänker KS, Entschladen F. *Divergent effects of norepinephrine, dopamine and substance P on the activation, differentiation and effector functions of human cytotoxic T lymphocytes*. BMC Immunol. 2009 Dec 8;10:62.
- [39] Takamoto T, Hori Y, Koga Y, Toshima H, Hara A, Yokoyama MM. *Norepinephrine inhibits human natural killer cell activity in vitro*. Int J Neurosci 1991;58(1-2) : 127-31.

- [40] Gan X, Zhang L, Solomon GF, Bonavida B. *Mechanism of norepinephrine – mediated inhibition of human NK cytotoxic function: inhibition of cytokine secretion, target binding, and programing for cytotoxicity.* Brain Behav Immun 2002; 16(3) : 227-46.
- [41] Bjurstöm H, Wang J, Ericsson I, Bengtsson M, Liu Y, Kumar-Mendu S, Issazadeh-Navikas S, Birnir B. GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes. J Neuroimmunol. 2008 Dec 15;205(1-2):44-50.
- [42] Tian J, Chau C, Hales TG, Kaufman DL. *GABA(A) receptors mediate inhibition of T cell responses.* J Neuroimmunol. 1999 Apr 1;96(1):21-8.
- [43] Wasilewska-Dziubińska E. *Rola naczyniowego peptydu jelitowego (VIP) i peptydu aktywującego cyklazę przysadki (PACAP) w mechanizmie uwalniania steroidów gonadowych.* Postępy nauk medycznych 2007; 10 : 414-419.
- [44] Delgado M, Ganea D. *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide inhibit T cel mediated cytotoxicity by inhibiting Fas ligand expression.* J Immunology 2000; 165: 114-123.
- [45] Delgado M, Ganea D. *Neuropeptides as modulators of macrophage function. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP.* Archiv Immunol et Therap Exp 2001;49: 101-110.
- [46] Shizomato T, Kincade PW. *Indirect suppression of IL-7 responsive B cell precursors by vasoactive intestinal peptide (VIP).* J Immunology 1997; 158:5178-5184.
- [47] Delgado M, Ganea D. *Neuropeptides as modulators of macrophage function. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP.* Archiv Immunol et Therap Exp 2001;49:101-110.
- [48] Bik W. *Naczynioruchowy peptyd jelitowy (VIP) – potencjalny czynnik immunomodulacyjny I jego rola w chorobach układu oddechowego.* Postępy Nauk Medycznych 2007; 10: 408-413.
- [49] Ohta K, Yamashita N. *Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation.* J Allergy Clin Immunol. 1999 Jul;104(1):14-21.
- [50] Taub DD. *Neuroendocrine interactions in the immune system.* Cellular Immunology 2008;252:1-6.
- [51] Kronfol Z, Remick DG. *Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry.* Am J Psychiatry 2000;157:683-694.
- [52] Ufnal M, Wolynczyk-Gmaj D. *Mózg i cytokiny – wspólne podłoże depresji, otyłości i chorób układu krążenia?* Postępy Hig Med Dosw 2011;65;228-235.
- [53] Green HF, Nolan YM. *GSK-3 mediates the release of IL-1 β , TNF- α and IL-10 from cortical glia.* Neurochem Int. 2012 Oct;61(5):666-71.
- [54] Long-Smith CM, Collins L, Toulouse A, Sullivan AM, Nolan YM. *Interleukin-1 β contributes to dopaminergic neuronal death induced by lipopolysaccharide-stimulated rat glia in vitro.* Journal of Neuroimmunology 2010; 226:20-26.
- [55] Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. *Cytokines and major depression.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2005;29(2):201-217.
- [56] Haas JD, Gonza'lez FHM, Schmitz S, Chennupati V, Fohse L, Kremmer E, Forster R. *CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN- γ -producing cd effector T cells.* Eur J Immunol 2009;39:3488-3497.

- [57] Moynes DM, Vanner SJ, Lomax AE. *Participation of interleukin 17A in neuroimmune interactions*. Brain Behavior and Immunity 2014;
- [58] Jóźwik A, Landowski J, Bidzan L, Fulop T, Bryl E, Witkowski JM. *Beta-Amyloid Peptides Enhance the Proliferative Response of Activated CD4+CD28+ Lymphocytes from Alzheimer Disease Patients and from Healthy Elderly*. PLoS ONE 2012;7(3):1-11.
- [59] Maes M, Cai Song C, Lin A, Bonaccorso S, Kenis G, Jongh R, Bosmans E, Scharpé S. *Negative Immunoregulatory Effects of Antidepressants: Inhibition of Interferon and Stimulation of Interleukin-10 Secretion*. Neuropsychopharmacology 1999; 20(4):370-379.
- [60] Ader R, Cohen N, Felten D. *Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and immune system*. The Lancet 1995;345:99-103.
- [61] Breunis M, Kupka R, Nolen A, Suppes T *High Numbers of Circulating Activated T Cells and Raised Levels of Serum IL-2 Receptor in Bipolar Disorder* Biol Psychiatry, 2003;53;157-165.
- [62] Tsai S, Chen K, Yang Y, Chen Ch, Lee J, Vijendra K Singh VK, Leu S.C. *Activation of indices of cell-mediated immunity in bipolar mania*. Biological Psychiatry 1999; 45:989–994.
- [63] Brietzke E, Stertza L, Fernandes BS, Kauer-Sant’Anna M, Mascarenhas M, Vargas AE, Chiesb JA, Kapczinski F. *Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder*. Journal of Affective Disorders 2009;116:214-217.
- [64] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972;26:239-257.
- [65] Syeed SA, Vochra H, Gupta A, Ganguly NK. *Apoptosis: Molecular machinery*. Current Science 2001;80: (3) 349-360.
- [66] Hordyjewska A, Pasternak K. *Apoptotyczna śmierć komórki*. Adv Clin Exp Med. 2005;14;(3)545-554.
- [67] Carmody RJ, Cotter TG. *Molecular events and mechanisms of apoptosis*. Sepsis 1998;2:9-19.
- [68] Stępień A, Izdebska M, Grzanka A. *Rodzaje śmierci komórki*. Postępy Hig Med Dosw 2007;61:420-428.
- [69] Elmore S. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicologic Pathology 2007;35:495-516.
- [70] Blaschke AJ, Weiner JA, Chun J. *Programmed cel death is a universal feature of empryonic and postnatal neuroproliferative regions throught the central nervous system*. The Journal of comparative neurology 1998;396:39-50.
- [71] Risher WCh, Eroglu C. *Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system*. Matrix Biology 2012; Apr;31(3):170-177.
- [72] Wójcik K. *Neurobiologia rozwojowa i inwolucyjna plastyczność mózgu*. Neurokogniistyka w patologii i zdrowiu;2011:162-170.
- [73] Prasad T, Wang X, Gray PA, Weiner JA. *A differential, developmental pattern of spinal interneuron apoptosis during synaptogenesis: Insights from genetic analyses of the protocadherin-γ gene cluster*. Development 2009; 135(24):4153-4164.
- [74] Vetulani J. *Mózg: fascynacje, problem, tajemnice*. Homini, Kraków 2011.
- [75] Górská T, Grabowska A, Zagrodzka J. *Mózg a zachowanie*. Wydawnictwo Naukowe PWN; Warszawa 2006.

- [76] Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR. *Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders*. Progress in Neurobiology 2014;112:24-49.
- [77] Turzyńska D, Skórzewska A, Sobolewska A, Płaźnik A. *Sposoby oddziaływania neuroprotektynowego w chorobie Parkinsona na przykładzie rasagiliny*. Postępy Psychiatrii i Neurologii 2005; 14(2):145-154.
- [78] Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. *Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus*. Bipolar Disord 2002; 4: 117-128.
- [79] Kim HW, Rapoport SI, Rao JS. *Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients*. Neurobiol Dis. 2010 Mar;37(3):596-603.
- [80] Leuner K, Pantel J, Frey C, Schindowski K, Schulz K, Wegat T, Maurer K, Eckert A, Muller WE. *Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease*. J Neural Transm 2007;(72):207-215.
- [81] Djordjević VV, Ristić T, Lazarević D, Cosić V, Vlahović P, Djordjević VB. *Schizophrenia is associated with increased levels of serum Fas and FasL*. Clin Chem Lab Med. 2012 Feb 10;50(6):1049-54.
- [82] Ivanova SA, Semke VY, Vetlugina TP, Rakitina NM, Kudyakova TA, Simutkin GG *Signs of Apoptosis of Immunocompetent Cells in Patients with Depression*. Neuroscience and Behavioral Physiology, Vol. 37, No. 5, 2007.
- [83] Szuster-Ciesielska A, Słotwińska M, Stachura A, Marmurowska-Michałowska H, Dubas-Ślęp H. *Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression*. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 2008; (32):686–694.
- [84] Fries GR, Vasconcelos-Moreno MP, Gubert C, Santos BT, da Rosa AL, Eisele B, Sartori J, Pfaffenseller B, Kapczinski F, Kauer-Sant'anna M. *Early apoptosis in peripheral blood mononuclear cells from patients with bipolar disorder*. J Affect Disord. 2014 Jan;152-154:474-7.
- [85] Bei E, Salpeas V, Pappa D, Anagnostara C, Alevizos V, Moutsatsou P. *Phosphorylation status of glucocorticoid receptor, heat shock protein 70, cytochrome c and Bax in lymphocytes of euthymic, depressed and manic bipolar patients*. Psychoneuroendocrinology. 2009 Sep;34(8):1162-75.
- [86] Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J. *Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders*. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 2004;(28): 559– 576.
- [87] Witkowski JM. *Advanced application of CFSE for cellular tracking*. Curr Protoc Cytom. 2008;Chapter 9:Unit9.25.
- [88] Wciórka J, Schaeffer E, Świtaj P, Waszkiewicz J, Krasuska K, Węgrzyn J, Woźniak P. *Skala Manii Becha-Rafaelsena i Skala Manii Younga – porównanie właściwości psychometrycznych dwóch narzędzi do oceny nasilenia zespołu maniakalnego*. Psychiatria Polska 2011; 1, 61-78.
- [89] Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. *Flow cytometry in biotechnology*. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 56:350-360.
- [90] Hasbold, J., Gett, A. V., Rush, J. S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J., Hodgkin, P. D. 1999. *Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*. Immunol. Cell Biol. 77: 516-522.
- [91] Kajta M. *Apoptosis in the central nervous system: mechanisms and protective strategies*. Pol. J. Pharmacol., 2004, 56, 689–700.
- [92] Cossarizza, A., Baccarani-Conti, M., Kalashnikova, G., and Franceschi, C. *A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993;197 (1): 40-45.

- [93] Piśkuła S, Sarzała MG. *Asymetria błon biologicznych – rozmieszczenie lipidów i niektórych białek enzymatycznych w płaszczyźnie poprzecznej błony*. Post Biochem 1984; 30:107-148.
- [94] Van England M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CMP. *A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture*. Cytometry 1996; 24: 131-139.
- [95] Włodkowiec D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. *Cytometry of apoptosis. Historical perspective and New advances*. Exp Oncol 2012; 34(3): 255-262.
- [96] Mitchell AJ. *Psychiatric aspects of chronic physical disease*. Medicine 2012;40(12):662-665.
- [97] Breder CD, Dinarello CA, Sabat CB. *Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus*. Science 1988;240: 321–324.
- [98] Bonaccorso S, Marino V, Puzella A, Pasquini M, Biondi M et al. *Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon alpha based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system*. J Clin Psychopharmacol 2002;22:86-90.
- [99] Vizi ES, Elenkov IJ. *Nonsynaptic noradrenaline release in neuro-immune responses*. Acta Biol Hung. 2002;53(1-2):229-44.
- [100] Rosenblatt JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS. *Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2014 Jan 25;53:23-34.
- [101] Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. *IL-2– and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2009;123(4):758–762.
- [102] Shipkova M, Wieland E. *Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation*. Clinica Chimica Acta 2012;413:1338-1349.
- [103] Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. *Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function*. Journal of Immunological Methods 2004;293:127-142.
- [104] Pietruczuk K, Jakuszkowiak K, Landowski J, Witkowski JM. *Porównanie wybranych parametrów układu immunologicznego u osób zdrowych i chorych na depresję*. Psychiatria 2005; 2(4):210-216.
- [105] Bryl E, Dąca A, Jóźwik A, Witkowski JM. *Human CD4^{low} CD25^{high} regulatory T cells indiscriminately kill autologous activated T cells*. Immunology. 2009;128:287-95.
- [106] Hopken UE, Winter S, Achtman AH, Kruger K, Lipp M. *CCR7 regulates lymphocyte egress and recirculation through body cavities*. Journal of Leukocyte Biology 2010;87:671-682.
- [107] Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, McColl SR. *A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system*. Cytokine&Growth Factor Reviews 2013;24:269-283.
- [108] Xu Y, Song G. *The role of CD40-CD154 Interaction in cell immunoregulation*. J Biomed Sci 2004; 11:426-438.
- [109] Starska K, Łukowski M. *Rola limfocytów Th i Tc w powstawaniu i progresji nowotworów głowy i szyi*. Otolaryngologia 2005;4(2):59-63.
- [110] Drexhage RC, Hoogenboezem TH, Versnel MA, Berghout A, Nolen WA, Drexhage HA. *The activation of monocyte and T cell networks in patients with bipolar disorder*. Brain, Behavior, and Immunity 2011; 25: 1206–1213.

- [111] Hartmann do Prado C, Rizzo LB, Wieck A, Lopes RP, Teixeira AL, Grassi-Oliveira R, Bauer ME. *Reduced regulatory T cells are associated with higher levels of Th1/TH17 cytokines and activated MAPK in type 1 bipolar disorder*. Psychoneuroendocrinology 2013;(38):667–676.
- [112] Breunis MN, Kupka RW, Nolen WA, Suppes T, Denicoff KD, Leverich GS, Post RM, Drexhage HA. *High Numbers of Circulating Activated T Cells and Raised Levels of Serum IL-2 Receptor in Bipolar Disorder*. Biol Psychiatry 2003;53:157–165.
- [113] Schoenbeck U, Mach F, Libby P. *Molecules in focus CD154 (CD40 ligand)*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2000;32: 687-693.
- [114] Boufidou F, Nikolaou Ch, Alevizos B, Liappas IA, Christodoulou GN. *Cytokine production in bipolar affective disorders patients under lithium treatment*. Journal of Affective Disorders 2004;82:309-313.
- [115] Kim YK, Jung HG, Myint AM, Kim H, Park SH. *Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder*. Journal of Affective Disorders 2007;104:91-95.
- [116] O'Brien SM, Scully P, Scott LV, Dinan TG. *Cytokine profiles in bipolar affective disorder: Focus on acutely ill patients*. Journal of Affective Disorders 2006;90:263-267.
- [117] www.informator.gumed.edu.pl/83p
- [118] www.bdbiosciences.com/
- [119] Ondigo BN, Park GS, Gose SO, Ho BM, Ochola LA, Ayodo GO, Ofulla AV, John ChC. *Standardization and validation of a cytometric bead assay to assess antibodies to multiple Plasmodium falciparum recombinant antigens*. Malaria Journal 2012;11:427-444.
- [120] Stelmaszczyk-Emmel A, Kopatys A, Górka E, Głodkowska-Mrówka E, Demkow U. *The usefulness of flow cytometric analysis of cytokines in peripheral blood and bone marrow plasma*. Postępy Hig Med Dosw 2013;67:879-886.
- [121] Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Mascarenhas M, Vargas AE, Chies JA, Kapczinski F. *Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder*. Journal of Affective Disorders 2009;116:214-217.
- [122] Guloksuz S, Cetin EA, Cetin T, Deniz G, Oral ET, Nutt DJ. *Cytokine levels in euthymic bipolar patients*. Journal of Affective Disorders 2010;126:458-462.
- [123] Barbosa IG, Machado-Vieira R, Soares JC, Teixeira AL. *The immunology of bipolar disorder*. Neuroimmunomodulation. 2014;21(2-3):117-22.
- [124] Young W. *Review of Lithium Effects on Brain and Blood*. Cell Transplantation 2009;18:951–975.
- [125] Kronfold Z. *Lymphocyte function in melancholia*. Life Sci. 1983;33: 241–247.
- [126] Schleifer S.J. *Lymphocyte function in major depressive disorder*. Arch. Gen. Psychiatry 1984; 41: 484–486.
- [127] Zabłocka A, Janusz M. *Struktura i funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego*. Postępy Hig Med. Dosw 2007;61:454-460.
- [128] Orre K, Wennström M, Tingström A. *Chronic lithium treatment decreases NG2 cell proliferation in rat dentate hilus, amygdala and corpus callosum*. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 2009;33:503–510.
- [129] Lisowska KA, Dębska-Ślizień A, Jasiulewicz A, Heleniak Z, Bryl E, Witkowski JM. *Hemodialysis affects phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes*. J Clin Immunol. 2012 Feb;32(1):189-200.
- [130] Smolewski P, Darzynkiewicz Z. *Współczesne metody badania apoptozy*. Acta Hematologica Polonica 2003;34:35-47.

- [131] Denecker G, Doms H, Van Loo G, Vercammen D, Grooten J, Fiers W, Declercq W, Vandenabeele P. *Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome c and in mitochondrial transmembrane potential*. FEBS Letters 2000;465:47-52.
- [132] Marczak A, Jóźwiak Z. Zaburzenia asymetrycznego rozmieszczenia fosfatydyloseryny w błonie komórkowej – najnowsze teorie. Postępy Biologii Komórki 2007;34:231-240.
- [133] Mobilization Wasserman MJ, Corson TW, Sibony D, Cooke RG, Parikh SV, Pennefather PS, Li PP, Warsh JJ. Chronic Lithium Treatment Attenuates Intracellular Calcium. Neuropsychopharmacology 2004;29:759-769.

8. STRESZCZENIE

Psychoneuroimmunologia to młoda, interdyscyplinarna gałąź nauk biomedycznych, zajmująca się badaniem wzajemnych powiązań trzech układów: nerwowego, endokrynnego i immunologicznego oraz ich interakcji z psychiką.

W pracy badano stan układu immunologicznego w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej (CHAD) w porównaniu do zdrowej kontroli. Analizowany był fenotyp limfocytów T pod kątem wybranych markerów aktywacji. Oceniano stężenia wybranych cytokin w surowicy. Analizowano parametry proliferacyjne limfocytów T oraz proces apoptozy tych komórek i komórek linii MOLT-4 uznawanych za model limfocytów T. Wszystkie te parametry były porównywane nie tylko pomiędzy zdrowymi a chorymi, ale także ze względu na fazę choroby (depresja lub remisja) oraz pod kątem przyjmowanych leków – węglanu litu lub kwasu walproinowego.

W pracy wykazano że limfocyty T osób chorych na CHAD wykazują fenotyp aktywacyjny i zmiany te wydają się być charakterystyczne dla choroby i zależne od jej aktualnej fazy. Poziomy badanych cytokin IL-17A, IL-10, IL-6, TNF- α wskazują na przewlekły stan zapalny towarzyszący CHAD oraz przesunięcie odpowiedzi immunologicznej chorych w kierunku odpowiedzi Th2. U chorych dochodzi do zmian dynamiki proliferacji limfocytów zarówno CD4⁺ jak i CD8⁺, co jest zależne od stosowanej terapii i może wpływać na efektywność odpowiedzi immunologicznej. Limfocyty osób chorych w porównaniu ze zdrowymi charakteryzują się większą wrażliwością na czynniki proapoptotyczne, natomiast leki normotymiczne w stężeniach terapeutycznych wykazują działanie cytoprotekcyjne.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że właściwości i funkcje limfocytów T w CHAD ulegają zmianie, również leki normotymiczne wpływają na funkcję limfocytów T.

9. ABSTRAKT

Psychoneuroimmunology is new branch of biomedical studies investigating the complex interactions between the three integrating systems of the body: the nervous, endocrine and immune systems and their reciprocal action with the human psyche.

The study investigated selected properties of the immune system in patients with bipolar disorder (BD) compared to healthy controls. The phenotype of T-lymphocytes including the activation markers was evaluated along with the serum cytokine profile. Proliferation kinetics of T-lymphocytes and apoptosis was assessed in ex-vivo cells and in MOLT-4 cell line, which is a model of T-lymphocytes. All the parameters were compared between the BD patients and healthy controls, in the BD group also the effect of the phase of the disease (depression or remission) and of the medication (lithium carbonate or valproic acid) was determined.

T-lymphocytes in BD disorder demonstrated activation phenotype which depends on the phase of the disease. The levels of the cytokines, IL-17A, IL-10, IL-6, TNF- α , suggest that BD is accompanied by the chronic inflammatory response with the immune response shifted towards the Th2 response. The proliferation dynamics of CD4⁺ and CD8⁺ in BD is altered in a way which depends on the therapy used and may affect the performance of the immune system. Lymphocytes of patients with BD show higher susceptibility to proapoptotic factors, while mood stabilisers, in therapeutic concentrations, show cytoprotective properties.

The results clearly demonstrate BD changes the properties and function of T-lymphocytes which can also be influenced by normotymic drugs.

Z A Ł Ą C Z N I K I

Z A Ł A C Z N I K N R 1

DEKLARACJA ŚWIADOMEJ ZGODY

na uczestnictwo w badaniach

**Wpływ leków normotymicznych na apoptozę oraz aktywację komórek mononuklearnych
krwi obwodowej u pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową.**

Po zapoznaniu się z informacją dla pacjenta oświadczam, że wyrażam zgodę na pobranie ode mnie 30 ml krwi w celu wykonania badań laboratoryjnych mających na celu ustalenie wpływu leków normotymicznych na apoptozę oraz aktywację komórek mononuklearnych krwi obwodowej.

data

podpis pacjenta

data

podpis prowadzącego badania

Z A Ł A C Z N I K N R 2

INFORMACJA DLA PACJENTA

Celem naszych badań jest odpowiedź na pytanie czy leki normotymiczne poza udowodnionym działaniem stabilizującym nastrój wykazują również działanie antyapoptotyczne i cytoprotekcyjne na limfocyty krwi obwodowej oraz jaki jest wpływ tych leków na aktywność proliferacyjną, cytotoksyczną i sekrecyjną komórek układu odpornościowego?

Tym samym chcemy udowodnić że istnieje ścisły związek pomiędzy układem odpornościowym a układem nerwowym i hormonalnym.

Pomimo że badania te należą do tzw. badań podstawowych to w przypadku udowodnienia cytoprotekcyjnego działania leków normotymicznych leki te mogą zyskać dodatkowe zastosowanie np. w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Udział pacjenta będzie polegał na jednorazowym oddaniu 30 ml krwi i rozwiązaniu testów dotyczących nastroju.

Z A Ł A C Z N I K N R 3

PROSZĘ WYPEŁNIAĆ DRUKOWANYMI LITERAMI - FORMULARZ DLA PACJENTA

Data — —

Imię i nazwisko: _____ **Wiek:** _____

Płeć: Mężczyzna ☐ Kobieta ☐ **Stan cywilny:** _____

Od kiedy choruje: _____ PESEL: _____

Papierosy: Tak ☐ ile: ____ **Kawa:** Tak ☐ ile: ____ **Alkohol:** Tak ☐ ile: ____
 Nie ☐ Nie ☐ Nie ☐

Aktywność zawodowa

Wykształcenie: _____

Zawód wykonywany: _____

Uczy się	Pracuje	Bezrobotny	Rencista / Emeryt	Pracujący/uczący się rencista
☐	☐	☐	☐	☐
		od kiedy: _____	od kiedy: _____	od kiedy: _____

Choroby współwystępujące:

Przyjmowane leki (mg/dobę):

Choroby psychiczne w rodzinie:

Uwagi:

Z A Ł A C Z N I K N R 4Data — —

Imię i nazwisko: _____

SKALA DEPRESJI BECKA*Ocena dotyczy ostatniego tygodnia.**W każdym punkcie należy zakreślić tylko jedną odpowiedź.*

A	0.	Nie jestem smutny ani przygnębiony.
	1.	Odczuwam często smutek, przygnębienie.
	2.	Przeżywam stale smutek, przygnębienie i nie mogę uwolnić się od tych przeżyć.
	3.	Jestem stale smutny i nieszczęśliwy, że jest to nie do wytrzymania.

B	0.	Nie przejmuję się zbyt przyszłością.
	1.	Często martwię się o przyszłość.
	2.	Obawiam się, że w przyszłości nic dobrego mnie nie czeka.
	3.	Czuję że przyszłość jest beznadziejna i nic tego nie zmieni.

C	0.	Sądzę, że nie popełniam większych zaniedbań.
	1.	Sadzę, że czynię więcej zaniedbań niż inni.
	2.	Kiedy spoglądam na to co robiłem widzę mnóstwo błędów i zaniedbań.
	3.	Jestem zupełnie niewydolny i wszystko robię źle.

D	0.	To co robię sprawia mi przyjemność.
	1.	Nie cieszy mnie to co robię.
	2.	Nic mi teraz nie daje prawdziwego zadowolenia.
	3.	Nie potrafię przeżywać zadowolenia i przyjemności; wszystko mnie nuży.

E	0.	Nie czuję się winny ani wobec siebie, ani wobec innych.
	1.	Dość często miewam wyrzuty sumienia.
	2.	Często czuję, że zawiniłem.
	3.	Stale czuję się winny.

F	0.	Sądzę, że nie zasługuję na karę.
	1.	Sądzę, że zasługuję na karę.
	2.	Spodziewam się ukarania.
	3.	Wiem, że jestem karany (lub ukarany).

G	0.	Jestem z siebie zadowolony.
	1.	Nie jestem z siebie zadowolony.
	2.	Czuję do siebie niechęć.
	3.	Nienawidzę siebie.

H	0.	Nie czuję się gorszy od innych ludzi.
	1.	Zarzucam sobie, że jestem nieudolny i popełniam błędy.
	2.	Stale potępiam siebie za popełnione błędy.
	3.	Winię siebie za wszystko złe, które istnieje.

I	0.	Nie myślę o odebraniu sobie życia.
	1.	Myślę o samobójstwie – ale nie mógłbym tego dokonać.
	2.	Pragnę odebrać sobie życie.
	3.	Popełnię samobójstwo, jak będzie odpowiednia sposobność.

J	0.	Nie płaczę częściej niż zwykle.
	1.	Płaczę częściej niż dawniej.
	2.	Ciągle chce mi się płakać.
	3.	Chciałbym płakać, lecz nie jestem w stanie.

K	0.	Nie jestem bardziej podenerwowany niż dawniej.
	1.	Jestem bardziej nerwowy i przykry niż dawniej.
	2.	Jestem stale zdenerwowany lub rozdrażniony.
	3.	Wszystko co dawniej mnie drażniło, stało się obojętne.

L	0.	Ludzie interesują mnie jak dawniej.
	1.	Interesuję się ludźmi mniej niż dawniej.
	2.	Utraciłem większość zainteresowań innymi ludźmi.
	3.	Utraciłem wszelkie zainteresowanie innymi ludźmi.

M	0.	Decyzję podejmuję łatwo jak dawniej.
	1.	Częściej niż kiedyś odwlekam podjęcie decyzji.
	2.	Mam dużo trudności z podjęciem decyzji.
	3.	Nie jestem w stanie podjąć żadnej decyzji.

N	0.	Sądzę, że wyglądam nie gorzej niż dawniej.
	1.	Martwię się tym że wyglądam staro i nie atrakcyjnie.
	2.	Czuję że wyglądam coraz gorzej.
	3.	Jestem przekonany, że wyglądam okropnie i odpychająco.

O	0.	Mogę pracować jak dawniej.
	1.	Z trudem rozpoczynam każdą czynność.
	2.	Z wielkim wysiłkiem zmuszam się do zrobienia czegokolwiek.
	3.	Nie jestem w stanie nic robić.

P	0.	Sypiam dobrze jak zwykle.
	1.	Sypiam gorzej niż dawniej.
	2.	Rano budzę się 1-2 godzin za wcześnie i trudno jest mi ponownie usnąć.
	3.	Budzę się kilka godzin z wcześnie i nie mogę usnąć.

Q	0.	Nie męczę się bardziej niż dawniej.
	1.	Męczę się znacznie łatwiej niż poprzednio.
	2.	Męczę się wszystkim co robię.
	3.	Jestem zbyt zmęczony, aby cokolwiek robić.

R	0.	Mam apetyt nie gorszy niż dawniej.
	1.	Mam trochę gorszy apetyt.
	2.	Apetyt mam wyraźnie gorszy.
	3.	Nie mam w ogóle apetytu.

S	0.	Nie tracę na wadze ciała (w okresie ostatniego miesiąca).
	1.	Straciłem na wadze więcej niż 2 kg.
	2.	Straciłem na wadze więcej niż 4 kg.
	3.	Straciłem na wadze więcej niż 6 kg.

T	0.	Nie martwię się swoim zdrowiem bardziej niż zawsze.
	1.	Martwię się swoimi dolegliwościami, mam rozstrój żołądka, zaparcie, bóle.
	2.	Stan mego zdrowia bardzo mnie martwi, często o tym myślę.
	3.	Tak, bardzo martwię się o swoje zdrowie, że nie mogę o niczym innym myśleć.

U	0.	Moje zainteresowania seksualne nie uległy zmianom.
	1.	Jestem mniej zainteresowany sprawami płci (seksu).
	2.	Problemy płciowe wyraźnie mnie nie interesują.
	3.	Utraciłem wszelkie zainteresowania sprawami seksu.

SUMA PUNKTÓW: _____

Tekst zweryfikowano w Instytucie Psychiatrii i Neurologii w Warszawie w 1997 roku.

Data — —

Imię i nazwisko: _____

SKALA DEPRESJI HAMILTONA (HAM-D)*Pytań od 18 do 21 w punktacji nie uwzględnia się.***1) Nastroj depresyjny.**

0.	Nie stwierdza się.
1.	Ujawniany przez pacjenta dopiero po zapytaniu.
2.	Ujawnia depresję spontanicznie.
3.	Stwierdza się niewerbalne przejawy depresji (wyraz twarzy; głos; płacz).
4.	Depresja stanowi jedyny typ nastroju ujawniany drogą werbalną i niewerbalną.

2) Poczucie winy.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Poczucie sprawienia zawodu innym, wymówki wobec siebie.
2.	Rozważania o winie, błędach popełnionych w przeszłości.
3.	Przekonanie że obecna choroba jest karą, urojenie winy.
4.	Omamy słuchowe o treści oskarżającej pacjenta, denuncjującej.

3) Zniechęcenie do życia, myśli, tendencje samobójcze.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Poczucie że nie warto żyć.
2.	Pragnienie (życzenie) śmierci, np. drogą naturalną.
3.	Myśli o samobójstwie, zamiary.
4.	Próby samobójcze (brać pod uwagę jedynie poważne).

4) Zaburzenia zasypiania

0.	Nie stwierdza się.
1.	Sporadyczne trudności z zasypianiem (oczekiwanie na sen ponad 0,5 godziny)
2.	Częste znaczne trudności z zasypianiem.

5) Sen płytki, przerywany.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Płytki niespokojny sen.
2.	Budzenie się w nocy; opuszczanie łóżka (nie oceniać budzenia się w związku z potrzebami fizjologicznymi)

6) Wczesne budzenie.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Budzenie się nad ranem i ponowne zasypianie.
2.	Budzenie się zbyt wczesne z niemożnością ponownego uśnięcia.

7) Aktywność złożona, praca.

0.	Nie stwierdza się zaburzeń aktywności.
1.	Poczucie obniżonej wydolności, niechęć do podejmowania aktywności złożonej.
2.	Utrata zainteresowań i chęci do działania, wykonywania pracy; hobby.
3.	Zmniejszenie liczby godzin przeznaczonych na aktywność złożoną (praca, rozrywki, hobby); w szpitalu – gdy pacjent zajmuje się aktywnością złożoną poniżej 3 godzin dziennie.
4.	Niezdolność do pracy, przerwa w pracy, w oddziale brak przejawów spontanicznej aktywności.

8) Spowolnienie, zahamowanie (myślenia, mowy, upośledzenie koncentracji uwagi, obniżenie aktywności ruchowej w czasie badania)

0.	Nie stwierdza się.
1.	Nieznacznie.
2.	Wyraźne spowolnienie.
3.	Na skutek zahamowania – trudność w przeprowadzeniu badania.
4.	Ośłupienie.

9) Niepokój, podniecenie ruchowe.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Zaznaczony niepokój manipulacyjny.
2.	Wyraźny niepokój manipulacyjny; przebieranie palcami, bawienie się włosami.
3.	Niepokój ruchowy; niemożność przebywania w jednym miejscu.
4.	Podniecenie ruchowe, wykręcanie rąk, obgryzanie paznokci, wrywanie włosów, przygryzanie warg.

10) Lęk – objawy depresyjne.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Subiektywne: napięcie, rozdrażnienie.
2.	Martwienie się drobiazgami.
3.	Cechy lęku w wyrazie twarzy i w wypowiedziach.
4.	Lęk i obawy ujawniane spontaniczne przez pacjenta.

11) Lęk – objawy somatyczne.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Łagodnie (nieznacznie) nasilone.
2.	Umiarkowanie nasilone.
3.	Znaczne (ciężkie) nasilenie.
4.	Nasilenie bardzo duże, dominuje.

12) Przewód pokarmowy, brak apetytu, zaparcia.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Brak apetytu, ale pokarmy spożywa bez pomocy personelu.
2.	Jada mało, pod namową lub przy pomocy personelu, stałe zaparcia.

13) Objawy somatyczne ogólne.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Uczucie ciężaru w głowie, karku, barkach, wzmożona męczliwość, utrata energii.
2.	Znaczne nasilenie dolegliwości wymienionych w punkcie 1.

14) Utrata libido, popędu seksualnego, zaburzenia miesiączkowania.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Nasilenie łagodne.
2.	Nasilenie znaczne.
x	Nie dotyczy.

15) Hipochondria.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Zaabsorbowanie problemem własnego ciała.
2.	Nadmierna dbałość o zdrowie, obawy przed chorobą.
3.	Narzekać i skargi na złe zdrowie, żądanie pomocy, leczenia.
4.	Urojenia hipochondryczne.

16) Ubytek masy ciała.

A	Ocena danych z wywiadu (przeszłość).
0.	Nie stwierdza się.
1.	Prawdopodobnie wystąpiła utrata masy w związku z obecną chorobą.
2.	Potwierdzona utrata masy ciała.

B	Ocena stanu aktualnego (oceniać okres 1 tygodnia).
0.	Poniżej 0,5 kg.
1.	Od 0,5 do 1 kg (na tydzień).
2.	Powyżej 1 kg (na tydzień).

17) Krytycyzm (wgląd).

0.	Poczucie obecności depresji jako choroby (krytycyzm zachowany).
1.	Krytycyzm częściowo zachowany – poczucie obecności choroby; ale jest ona następstwem np. wadliwej diety; infekcji przemęczenia itp.
2.	Brak krytycyzmu.

18) Wahania dobowe samopoczucia.

A	Obecność wahań dobowych
0.	Nie stwierdza się.
1.	Gorzej rano.
2.	Gorzej wieczorem.

B	Nasilenie wahań dobowych.
0.	Nie stwierdza się.
1.	Łagodne.
2.	Wyraźne.

19) Depersonalizacja, derealizacja.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Łagodnie wyrażone.
2.	Umiarkowane nasilenie.
3.	Nasilone znaczne.
4.	Skrajnie ciężkie.

20) Urojenia.

0.	Nie stwierdza się.
1.	Podejrzliwość, ksobność.
2.	Podejrzliwość, ksobność.
3.	Urojenia ksobne, prześladowcze.
4.	Omamy słuchowe o treści prześladowczej.

21) Natręctwa, fobie

0.	Nie stwierdza się.
1.	Umiarkowanie wyrażone
2.	Znacznie nasilone.

SUMA PUNKTÓW: _____

Z A Ł A C Z N I K N R 5Data — —

Imię i nazwisko: _____

SKALA MANII YOUNGA**A) Podwyższony nastrój.**

0.	Nie występuje.
1.	Nastrój lekko lub prawdopodobnie podwyższony w trakcie badania.
2.	Wyraźne subiektywnie odczuwane podwyższenie nastroju, optymizm, wiara w siebie; radość; stosownie do okoliczności.
3.	Podwyższenie nastroju nieadekwatne do okoliczności, nadmierne poczucie humoru.
4.	Stan euforii; niestosowny śmiech, śpiewanie.

B) WzmóŜona aktywność ruchowa/energia

0.	Nie występuje.
1.	Subiektywnie odczuwane wzmóŜone poczucie energii.
2.	OŜywienie; wzmóŜona gestykulacja.
3.	Przejawy nadmiernej energii; okresowa nadmierna aktywność, niepokój ruchowy (moŜliwy do opanowania przez chorego).
4.	Pobudzenie ruchowe; ciągła nadmierna aktywność (niemoŜliwa do opanowania przez chorego).

C) Popęd seksualny.

0.	Prawidłowy.
1.	Lekko lub prawdopodobnie wzmóŜony.
2.	Wyraźne wzmóŜenie popędu seksualnego subiektywnie odczuwane w trakcie badania.
3.	Spontanicznie ujawniane zainteresowanie sprawami seksu, obszernie wypowiedzi na tematy seksualne, chory sam zgłasza wzmóŜoną aktywność seksualną.
4.	Jawne zachowanie seksualne (w stosunku do pacjentów, personelu lub osoby przeprowadzającej badanie).

D) Sen.

0.	Chory nie podaje skrócenia snu.
1.	Sen o godzinę krótszy niż normalnie.
2.	Sen o więcej niż godzinę krótszy niż normalnie.
3.	Chory zgłasza mniejszą potrzebę snu.
4.	Chory zaprzecza, że odczuwa potrzebę snu.

E) Drażliwość

0.	Nie występuje.
2.	Subiektywne odczuwanie wzmożone poczucie drażliwości.
4.	Okresowe przejawy rozdrażnienia w trakcie badania, epizody wybuchów gniewu lub rozdrażnienia na oddziale w ostatnim okresie.
6.	Częste przejawy rozdrażnienia w trakcie badania, chory przez cały czas zachowuje szorstkość i lakoniczność w stosunku do badającego.
8.	Chory nastawiony wrogo, odmawia współpracy, niemożliwe przeprowadzenie badania.

F) Mowa (szybkość i fluencja)

0.	Prawidłowa
2.	Subiektywne poczucie nadmiernej rozmowności.
4.	Chory okresowo mówi dużo lub szybko, czasami występuje gadatliwość.
6.	Przymus mówienia, mowa nadmiernie szybka, znacznie zwiększona fluencja, trudność w przerywaniu wypowiedzi.
8.	Ciągły potok mowy niemożliwy do przerywania.

G) Formalne zaburzenia myślenia i wypowiedzi.

0.	Nie występują.
1.	Zwiększona drobiazgowość, lekkie rozproszenie wątku, szybszy bieg myśli.
2.	Rozproszenie toku myślenia, utrata wątku, częsta zmiana tematu, szybkie następowanie myśli jednej za drugą.
3.	Gonitwa myśli, przeskakiwanie z tematu na temat, trudno podążyć za biegiem myśli, rymowanie, echolalia.
4.	Inkoherencja (całkowity bezład) myśli, niemożliwe porozumienie z chorym.

H) Zaburzenia treści myślenia.

0.	Nie występują.
2.	Słabo uzasadnione (nieracjonalne) plany, nowe zainteresowania.
4.	Nadzwyczajne projekty lub przedsięwzięcia, nadmierna religijność.
6.	Idee wielkościowe lub paranoidalne, idee odniesienia (ksobne).
8.	Urojenia, omamy.

I) Zachowania destrukcyjne lub/i agresywne.

0.	Nie występują, chory chętny do współpracy.
2.	Sarkastyczność, okresowa hałaśliwość, nieufność.
4.	Chory zgłasza liczne pretensje, wypowiada groźby pod adresem osób na oddziale.
6.	Chory grozi badającemu, krzyczy, prowadzenie badania jest utrudnione.
8.	Chory agresywny czynnie, niszczy przedmioty, przeprowadzenie badania jest nie możliwe.

J) Wygląd.

0.	Odpowiedni strój i uczesanie.
1.	Minimalne zaniedbania.
2.	Średnio nieuczesany, przesadnie ubrany
3.	Rozczochrany, jaskrawo umalowany.
4.	Kompletnie zaniedbany, udziwniony ubiór.

K) Wgląd w chorobę.

0.	Nie neguje choroby, zgadza się na leczenie.
1.	Prawdopodobnie jest chory.
2.	Przyznaje się do zaburzeń ale zaprzecza chorobie.
3.	Prawdopodobnie ma jakieś zaburzenia ,ale zaprzecza chorobie.
4.	Zaprzecza zaburzeniom i chorobie.

Z A Ł A C Z N I K N R 6

PROSZĘ WYPEŁNIAĆ DRUKOWANYMI LITERAMI - FORMULARZ DLA LEKARZA

Lekarz prowadzący: _____Data — — **Imię i nazwisko:** _____ **Wiek:** _____**Płeć:** Mężczyzna ☐ Kobieta ☐ **Stan cywilny:** _____Od kiedy choruje: _____ **PESEL:** _____

Początek choroby:

Dynamika przebiegu:

Motywacja pacjenta do leczenia:

OPIS STANU PSYCHICZNEGO:

A	Świadomość	1. Jasna 2. Zaburzenia ilościowe: (senność, półśpiączka, śpiączka) 3. Zaburzenia jakościowe: (splątanie, majaczenie)
B	Orientacja co do czasu, miejsca, otoczenia i własnej osoby.	1. Prawidłowa 2. Nieco osłabiona 3. Znacznie osłabiona 4. Zniesiona
C	Nastrój	1. Dostosowany do sytuacji 2. Dystymiczny 3. Obniżony (nieznacznie, umiarkowanie, znacznie) 4. Podwyższony (nieznacznie, umiarkowanie, znacznie) 5. Dysforyczny (gniewliwy)

D	Napęd	1. Prawidłowy 2. Osłabiony, osłupienie (stupor) 3. Wzmózony (pobudzenie) 4. Ruchy mimowolne, stereotypie, persewercje, kompulsje, negatywizm, deficyt lub nadmiar ruchów dowolnych.
E	Afekt	1. Modulacja prawidłowa, słabo modulowany 2. Napięty sztywny, zalegający 3. Błady, stępiaty.
F	Emocje (np. lęk, złość, radość)	1. Prawidłowo wyrażone 2. Nadmiernie wyrażone 3. Słabo wyrażone 4. Labilność (chwiejność) 5. Paratymia, paramimia, parafonia, katatymia.
G	Popędy (np. samozachowawczy, łaknienia, seksualny)	1. Prawidłowy 2. Osłabiony 3. Zniesiony 4. Wzmózony
H	Uwaga	1. Skupienie (prawidłowe, uwaga rozproszona, wielowątkowość) 2. Przerzutowość
I	Pamięć	1. Dawna (prawidłowa, osłabiona, luki pamięciowe) 2. Świeża (prawidłowa, osłabiona, luki pamięciowe) 3. Operacyjna (prawidłowa, osłabiona, luki pamięciowe)
J	Osobowość	1. Prawidłowa 2. Nieprawidłowa (dysocjalna, bierno-zależna, bierno-agresywna, neurotyczna, charakteropatyczna) 3. Struktura zwarta 4. Rozpad struktury
K	Spostrzeganie	1. Niezaburzone 2. Złudzenia 3. Omamy (halucynacje)

L	Myślenie	1. Prawidłowe 2. Zaburzenia toku: a) ilościowe: przyspieszenie, zwolnienie b) jakościowe: splątanie 3. Zaburzenia treści (urojenia)
M	Krytycyzm	1. Prawidłowy 2. Osłabiony 3. Zniesiony
N	Uczuciowość wyższa (przyjaźń, miłość, patriotyzm)	1. Zachowana 2. Osłabiona, zubożona 3. Zniesiona

UZYSKANE ILOŚCI PUNKTÓW W SKALACH PSYCHIATRYCZNYCH:

1. Skala Depresji Becka _____
2. Skala Depresji Hamiltona (HAM-D) _____
3. Skala Manii Younga _____

PRZYJMOWANE LEKI (dawki):

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

ROZPOZNANIE NA DZIEŃ BADANIA:

1. Depresja w przebiegu CHAD
2. Hipomania / Mania w przebiegu CHAD
3. CHAD – remisja
4. CHAD – szybka zmiana faz, stan mieszany
5. Uwagi: _____

