



AF PIA HØGH PLOUGMANN
AFDELINGSBIOANALYTIKER
CENTER FOR PSYKIATRISK FORSKNING
ÅRHUS UNIVERSITETSHOSPITAL, RISSKOV

Brain-Derived Neurotrophic Factor – en biokemisk markør for depression?

Forsøg afslørede signifikant forskel på "deprimerede" og "normale" rotter. Dette viser, at BDNF og dermed neuronal plasticitet er involveret i depression, ikke bare på RNA-niveau, men helt ud på protein-niveau.

Afgangsprojektet på den sundhedsfaglige diplomuddannelse er en opgave, der afspejler de forskellige moduler de studerende sammensætter uddannelsen af. Det kan således enten være litteraturstudier eller undersøgelser lavet i laboratoriet.

Da jeg arbejder på Center for Psykiatrisk Forskning, valgte jeg at optimere og validere et enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) kit til måling af proteinet, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), et protein, der menes at være påvirket ved depression. Efterfølgende blev mængden af dette protein

bestemt i hjernevæv, serum og cerebrospinalvæske (CSF) fra en genetisk rotte-depressionsmodel.

I denne artikel vil jeg præsentere de opnåede resultater fra den genetiske rotte-depressionsmodel, med henblik på at bruge BDNF som biokemisk markør ved diagnosticeringen af depression.

En invaliderende sygdom

Depression er en alvorlig, i mange tilfælde livstruende sygdom, der rammer 10-20 % af befolkningen, kvinder bliver endvidere oftere deprimerede end mænd(1). Ifølge WHO vil depression være verdens 2. mest belastende sygdom i år 2020, hvorimod den i dag er den 4. mest belastende sygdom(2).

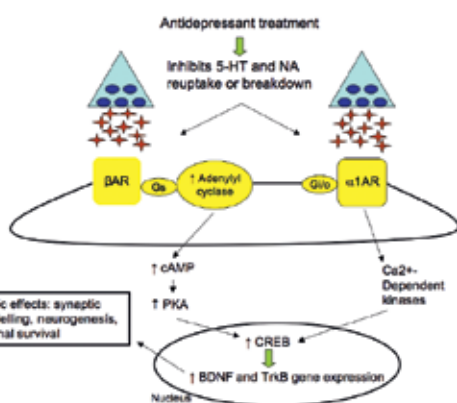
Da depression er en meget invaliderende sygdom med et stort medicinforbrug, er det en stor udgift for samfundet(1). Mange patienter har fysiske symptomer, som vanskeliggør diagnosen depression(1), og derfor vil målingen af en biokemisk markør kunne hjælpe med diagnosticeringen af de-

pression på et tidligere tidspunkt.

En hypotese i forbindelse med depression er neuroplasticitet (hjernens evne til at forandre sig). Studier af depressive patienter har således vist en reduktion af hippocampus, hvilket tyder på tab af neuroner og gliaceller.

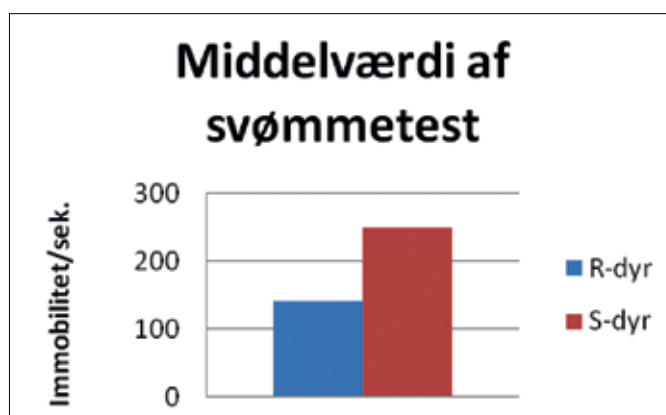
Forskellige signalveje er involveret i neuroplasticitet. Behandling med antidepressivt medicin øger serotonin- og noradrenalin-koncentrationen i synapsespalten, ved at hæmme deres reuptake i den præsynaptiske neuron. Dette fører til regulering af postreceptor, intracellulære signalveje og expression af forskellige gener(3). En af disse signalveje er CREB-kaskaden, hvor opregulering af cAMP fører til en opregulering af CREB. Denne aktivering af CREB medfører højere expression af nogle gener, heriblandt BDNF (figur 1)(3).

BDNF er et 27 kDa stort noncovalent bundet homodimert protein, der findes i det centrale nervesystem samt i det perifere nervesystem (4, 5), endothelceller og trombocytter(6). BD-



FIGUR 1

CREB-kaskaden. Behandling med antidepressiva hæmmer reuptaket af serotonin og noradrenalin. Dette medfører bl.a., at cAMP opreguleres, og dermed sker der også en opregulering af CREB. Aktiveringen af CREB fører til øget expression af forskellige gener, bl.a. BDNF og dennes receptor TrkB(3).



FIGUR 2

Dyrene testet i Forced Swim Test. FSL-dyrene er gennemsnitlig immobile i 248 sek., hvorimod FRL-dyrene kun er immobile i 140 sek.

TABEL 1

Normalfordeling				
	FSL		FRL	
	hippocampus	serum	hippocampus	serum
p-værdi	0,4345	0,4278	0,516	0,5332

Normalfordeling. P-værdierne indikerer, om en gruppe er normalfordelt eller ej, p-værdier < 0,05 findes ved nongaussiske fordelinger, n = 8. Beregnet vha. programmet GraphPad Prism.

NF's funktion er proliferering, differenciering og overlevelse af neuroner.

Humane studier med depressive patienter har vist, at BDNF målt i blodet er nedsat under en depression(7-9). Ligeledes har post-mortem analyse af hjernen fra behandlede depressive patienter vist, at mængden af BDNF er øget, i forhold til ubehandlede patienter(10). Dyreforsøg har ligeledes vist, at behandling med antidepressiv medicin og elektrochok påvirker hjernens indhold af BDNF(11-13). Der er dog også vist forandringer i BDNF-koncentrationen i blodet ved andre neuropsykiatriske sygdomme, såsom skizofreni(14) og alzheimers sygdom(15).

Ved hjælp af vores genetiske rotte-depressionsmodel undersøgte vi følgende

- Korrelation af BDNF i væv, serum og CSF
- Er der statistisk forskel på "normale" og "deprimerede" rotter

Materialer og metode

Materialer

Analysen

BDNF måles v.h.a. ELISA kit fra Promega (Promega, Wallisellen, Schweiz). Analysen udføres, som protokollen beskriver (16), dog laves standardkurven i området 0-300 pg/ml. Standardkurven til vævsprøverne laves i lysisbuffer, der består af 100 mM Tris-HCL (pH 7,2), 400 mM NaCl,

4 mM EDTA, 0,05 % NaAzid, 0,5 % gelatine, 0,2 % triton-X 100, 2 % BSA og 1*volumen complete (indeholder

forskellige proteasehæmmere). Standardkurven til serum og CSF laves i 1* Block & Samplebuffer, der følger med kittet.

Der laves en standardkurve til serum og væv på hver plade. Pladen vaskes på en pladevasker (ELX autostrip washer Bio-Tek instruments, INC) og aflæses på en pladereader (EL 800 Universal Microplate reader, Bio-Tek instruments, INC). Ifølge producenten har analysen en specificitet på > 97 %, og sensitiviteten er 15,6 pg/ml(16).

Vævsprøverne kan syrebehandles, hvilket medfører, at proBDNF også frigives. Men da vi var interesseret i det modne BDNF, undlod vi dette trin.

Forsøgsdyr

Dyrene, der bruges til forsøget, er Flinders Sensitive- og Flinders Resistant-Line rotter, FSL- og FRL-rotter, 8 dyr i hver gruppe. Denne genetiske rotte-depressionsmodel er lavet vha. forædling. FSL-dyrenes fænotype ligner meget depressive patienters fænotype(17). Dyrene avles på stedet og holdes to og to sammen i et bur med savsmuld, bidpend og tunnel. De har fri adgang til foder og vand. Lyset styres automatisk, og er tændt mellem 7.00 og 19.00. Dyrene testes med Forced Swim Test (FST) for at verificere, om de er "deprimerede" (FSL) eller "normale" (FRL). Dette måles ud fra dyrenes grad af immobilitet.

Metode

For at standardisere forsøget mest muligt valgte vi at

- Der bruges kun hanner til forsøget.

- Rotterne var alle 15-16 uger.
- Dyrene blev slået ned mellem 10.30 og 11.30.
- Venstre side af vævet analyseres.
- Prøverne analyseres inden 6 måneder.
- Det samme lot.nr. bruges til alle prøverne.
- Prøverne analyseres i dobbeltbestemmelse.
- Serum fortyndes 1:20 med block og samplebuffer.
- Hippocampus fortyndes 1:12 med lysisbuffer.
- CSF analyseres ufortyndet.

På aflivningsdagen indgives 2 ml pentobarbital 200 mg/ml, lidocainhydroxychlorid 20 mg/ml IP.

Cerebrospinalvæske (CSF)

CSF tages i det suboccipitale hulrum, lokaliseret caudalt for cerebellum under duramater. Væsken overføres til 1,5 ml eppendorfrør, der placeres på is med det samme. Mængden af blod i CSF vurderes visuelt. Spinalvæsken centrifugeres (3000 rpm i 10 min og 4°) inden 5 min., supernatanten afpippet og fryses ved -80°.

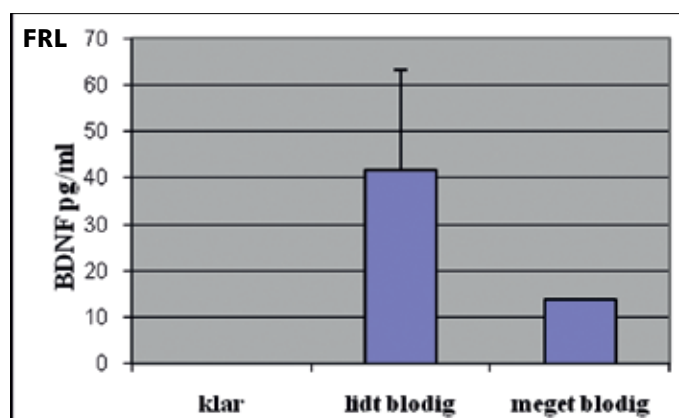
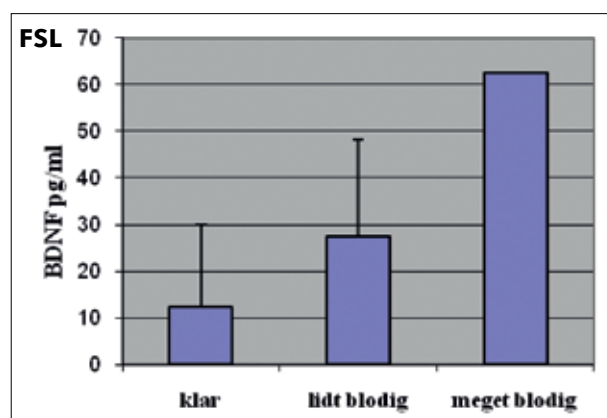
Blod

Dyret dekapiteres, og blodet opsamles i glas uden antikoagulant med gel, og stilles ved stuetemp.

Centrifugeres, 1/2-1½ time efter de er taget, (3000 rpm i 10 min. og 4°). Supernatanten afpippet og fryses ved -80°.

Hjernevæv

Hjernen tages ud og dissekeres på en kold flise. Efter dissekering fryses vævet på tør is og opbevares efterfølgende ved -80°. Hippocampus lyseres og homoge-

**FIGUR 3**

Dyrene inddelt i "deprimerede"(FSL) og "normale"(FRL) rotter. Mængden af blodtilblandingen i CSF-prøven inddeles i 3 kategorier for at se, om BDNF-koncentrationen påvirkes af blodmængden. n=7 for FSL-dyrene og n=6 for FRL-dyrene. Der hvor der ingen spredning er på resultaterne, skyldes det, at n=1.

niseres i 10* volumen med iskold lysis-buffer, se tidligere, vha. en polytron i 30 sek. Prøverne centrifugeres 20 min. ved 11.000 g og 4°. Supernatanten afpippettes og fryses ved -80°.

>>> Analysering

Alle prøver analyseres på samme plade, samtidig analyseres en vævsprøve som baggrund, denne værdi trækkes fra vævsprøvernes resultat. Da det ikke er muligt at få en kommercielt fremstillet kontrol, bestemte vi indholdet af BDNF i to tilfældige prøver og brugte dem som kontroller.

Statistiske beregninger

Til beregning af normalfordelte tal bruges D'Agostino-Pearson omnibus K2-test, hvor lave p-værdier, $p \leq 0,05$, er udtryk for nongaussisk fordeling. Små testgrupper har dog ikke meget power til at finde en sådan nongaussisk fordeling(18).

Korrelationskoefficienten, Pearsons r, angiver graden af samvariationen af parrede data. Jo mere samvariation, der er mellem tallene, jo tættere på 1 eller -1 ligger r(19). Hvis der er korrelation mellem to parametre, ligger p-værdien under 0,05. r^2 fortæller, i hvor mange % af tilfældene, en ændring af den ene parameter skyldes en ændring af den anden parameter, hvis f.eks. $r^2 = 0,1825$, værdien mellem serum og hippocampus i FSL-gruppen, skyldes 18 % af de ændringer, der sker i serum, en ændring i hippocampus(18).

Den statistiske forskel mellem FSL og FRL grupperne findes v.h.a. en tosidet parret t-test, $p \leq 0,05$.

Resultat Forsøgsdyr

Den måde, vi bruger FST på, er som en screeningsmodel, hvor vi populært sagt "spørger" rotten, hvor deprimeret den er. FRL-dyr er "normale" dyr og vil forsøge at komme væk, når de bliver lagt ned i cylinderen med vand, hvorimod FSL-dyrene de "syge" dyr, hurtigere op-

giver håbet om at komme væk og dermed ligger mere stille (se figur 2).

Dette giver os to grupper af dyr, der er signifikant forskellige fra hinanden ($p < 0,001$) og kan bruges til forsøget.

A: Korrelation af BDNF i væv, blod og CSF

Indholdet af BDNF i CSF lå lige omkring detektionsgrænsen. Der er derfor stor variation imellem dyrene. For at undersøge betydningen af blod i CSF blev prøverne inddelt i 3 grupper, klar, lidt blodig og meget blodig (figur 3).

Mht. FSL- dyrene tyder det på, at øget mængde af blod medfører øget mængde af BDNF.

FRL-dyrene følger dog ikke det mønster. Da værdierne samtidig er meget lave, er det ikke muligt at undersøge korrelationen mellem CSF og hippocampus. Korrelationsfaktoren beregnes derfor mellem grupperne på hippocampus og serum. BDNF-koncentrationerne inden for grupperne testes for normalfordeling (se tabel 1, side 13). Herefter beregnes korrelationskoefficienten (se figur 4 og 5).

B: Statistisk forskel på de "normale" og "depressive" rotter?

Da indholdet af BDNF i CSF var meget lavt, beregnes der ikke yderligere på disse resultater. Forskellen beregnes på hippocampus og serum, v.h.a. en parret t-test. Indholdet af BDNF i FSL-rotterne beregnes i % i forhold til BDNF-indholdet i FRL-rotterne (figur 6).

Diskussion

A: Korrelationen af BDNF i væv, blod og CSF

Korrelationen af BDNF skal bidrage til viden om BDNF som biologisk markør for depression. Hvis der er en korrelation, er det muligt at estimere en værdi i hjernen, som muligvis kan fortælle noget om patienternes psykiske tilstand.

Den mængde af BDNF, vi kunne ana-

lyserer i rotte-CSF, lå omkring detektionsgrænsen, der ifølge protokollen er 15,6 pg/ml(16). Lave absorptions giver høj spredning på BDNF-koncentrationerne, derfor er det for usikkert at bruge disse værdier til noget. BDNF-niveauet i humant serum ligger mellem 11- 30 ng/ml(7, 9, 14, 20, 21), hvori- mod niveauet i rotteserum BDNF ligger mellem 4-10 ng/ml(22, 23). Niveauet af BDNF målt på CSF fra raske personer ligger på 200 pg/ml(24), på baggrund heraf havde vi forventet, at BDNF i rotte CSF var lavere, hvis BDNF i CSF korrelerer med serum.

Den blodtilblanding, vi havde i vores prøver, så ud til at spille en rolle, når vi så på FSL-rotterne, men FRL-rotterne viste ikke den samme tendens. Grunden til denne forskel er sikkert for få dyr i hver gruppe.

For at kunne udtale sig om brugen af CSF som materiale, til målinger af BDNF i forbindelse med depression, skal humant CSF undersøges.

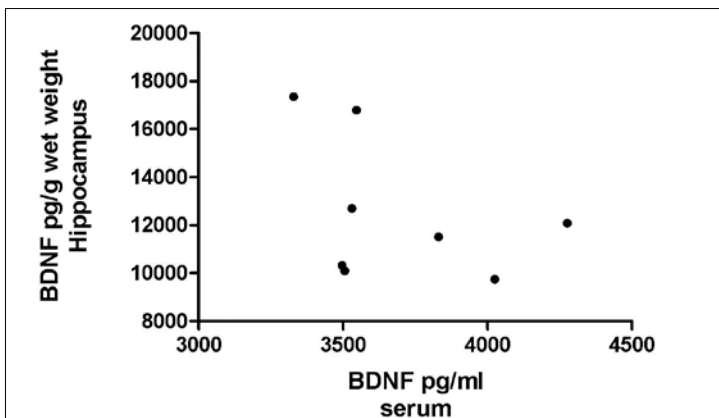
BDNF-koncentrationerne var normalt fordelte, men gruppernes størrelse giver ikke stor power. Vi skal derfor teste for normalfordelte tal, når BDNF skal måles i større forsøg.

Korrelationskoefficienten hos de "deprimerede" rotter viste ingen sammenhæng mellem serum og hippocampus. Derimod var der en lidt større sammenhæng mellem værdierne i de "normale" rotter. Det er meget muligt, at korrelationskoefficienten vil blive større, hvis vi havde flere dyr i hver gruppe. Ud fra resultaterne er det ikke muligt at estimere en BDNF-koncentration i hjernen, vha. serum-BDNF-koncentrationen.

Den mængde af BDNF, vi kan detektere i Flinders-rotten, er højere end de værdier, andre har fundet på den samme rottestamme, og vi finder en forskel imellem grupperne, hvilket ikke var tilfældet i tidligere publikationer(12, 25).

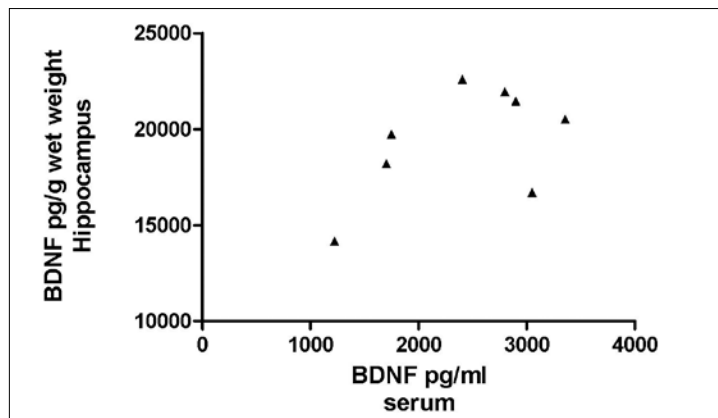
B: Statistisk forskel på "normale" og de "depressive" rotter

Den statistiske forskel på grupperne



FIGUR 4

Beregning af korrelationskoefficienten, Pearsons r for FSL-dyrene. Serum/hippocampus: $r = -0,4272$, $p = 0,2911$, $r^2 = 0,1825$ Beregnet vha. programmet GraphPad Prism.



FIGUR 5

Beregning af korrelationskoefficienten, Pearsons r for FRL-dyrene. Serum/hippocampus: $r = 0,5303$, $p = 0,1764$, $r^2 = 0,2812$ Beregnet vha. programmet GraphPad Prism.

findes vha. en tosidet parret t-test.

Der er statistisk forskel mellem grupperne både i serum og i hjernen.

Resultaterne fra hippocampus stemmer overens med det, vores laboratorium fandt på mRNA-niveau, nemlig at indholdet af BDNF i hippocampus er nedsat i FSL-dyrene. Dette tyder på, at BDNF er nedreguleret i hjernen under en depression, både på RNA- og proteinniveau. I serum finder vi også en signifikant forskel på grupperne. Overraskende er BDNF-koncentrationen dog forhøjet i de "deprimerede" rotter. Vores fund i hjernevævet er blevet bekræftet v.h.a. Western Blot (data ikke vist). Derimod var det ikke muligt at detektere BDNF i serum v.h.a. denne teknik.

Ud fra disse beregninger må vi konkludere, at der er stor forskel på de to grupper af dyr. Det betyder, at selv om vi ikke kan finde en korrelation mellem blod og væv, er de "deprimerede" rotter signifikant anderledes end deres kontroller.

Konklusion

Brugen af BDNF som biologisk markør, når patienter skal udredes for en depression, blev ikke afkræftet, selv om vi, i vores genetiske rotte-depressionsmodel, ikke kunne finde en korrelation mellem mængden af BDNF i blodet, CSF og hjernen. Derimod fik vi bekræftet, at der er signifikant forskel på "deprimerede" og "normale" rotter. Dette viser, at BDNF og dermed neuronal plasticitet er involveret i depression, ikke bare på RNA niveau, men helt ud på protein-niveau.

Brugen af BDNF som markør kræver yderligere undersøgelser på deprimerede patienter og matchende kontroller. Dels for at finde ud af, om der er forskel på de to grupper, men også for at undersøge, om det er muligt, at definere et normalområde for BDNF-koncentrationen i blod, således at laboratorierne kan afgive resultater, der er nemme at tolke for rekvirenten.

Perspektivering

Denne undersøgelse tyder, som mange andre på, at BDNF og neuroplasticitet er relateret til depression. Den genetiske rotte-depressionsmodel er stadig af stor betydning i relation til yderligere information omkring BDNF's rolle under en depression. Et forsøg, hvor vi giver både "deprimerede" og "normale" rotter et velkendt antidepressiv middel, for derefter at måle niveauet af BDNF både i hjernen og i blodet kunne underbygge hypotesen om BDNF's betydning under en depression.

Endvidere vil flere undersøgelser af patienter og matchende kontroller bidrage med yderligere viden om målinger af BDNF i blodet og dermed brugen af BDNF som depressionsmarkør.

I nær fremtid skal vi analysere BDNF i serumprøver fra ca. 900 personer, der deltager i det såkaldte PRISME projekt (Psykiske Risikofaktorer i arbejdsmiljøet og biologisk mekanisme for udvikling af stress, udbrændthed og depression). Om 1½ år skal forsøgspersonerne igen have taget blodprøver, hvor vi så får mulighed for at analysere BDNF en gang til, på de samme personer. Dette giver en mulighed for at finde en sammenhæng mellem BDNF og depression.

Til udarbejdelse af projektet og som sparringspartner har jeg fået stor hjælp af:

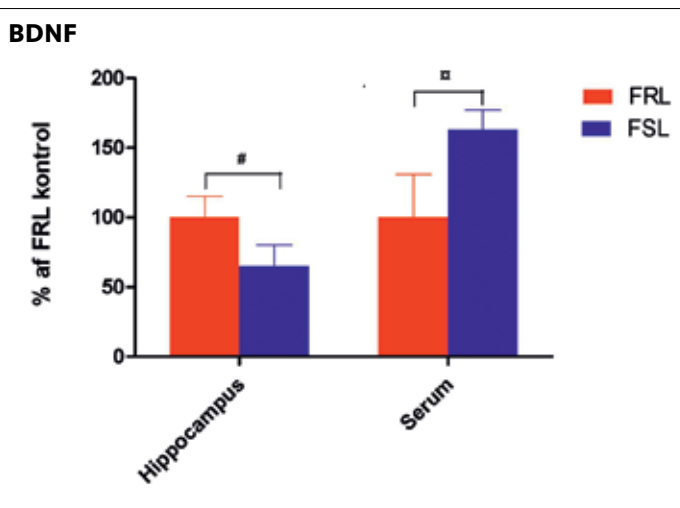
- *Betina Elfving, farmaceut, Center for Psykiatrisk Forskning, Risskov*

Derudover har jeg modtaget dyr til projektet og gode råd af:

- *Gregers Wegener, overlæge, Center for Psykiatrisk Forskning, Risskov*
- *Jørgen Hasselstrøm, kemiker, Klinisk Biokemisk Laboratorium, Risskov*

Endvidere er ELISA-kittene sponsoreret af:

- *Danske Bioanalytikernes Uddannelses- og Forskningsfond*
- *Center for Psykiatrisk Forskning*



FIGUR 6

Forskellen på de to grupper udtrykt i % af FRL-rotterne. Der er signifikant forskel på FRL- og FSL-rotterne både i hippocampus og serum, $p < 0,001$

REFERENCE LIST

1. WHO. WHO. 4-27-2007. <http://www.searo.who.int/en/Section1174/Section1199/Section1567/Section1826.htm> Ref Type: Internet Communication
2. WHO. WHO. 1-3-2008. http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/print.html Ref Type: Internet Communication
3. Oliè J.P., Costa E Silva J.A., Macher J.P., Neuroplasticity (Science Press Ltd, London, 2004).
4. P. Ernfors, C. Wetmore, L. Olson, H. Persson, *Neuron* 5, 511 (1990).
5. C. Radziejewski, R. C. Robinson, P. S. Distefano, J. W. Taylor, *Biochemistry* 31, 4431 (1992).
6. H. Yamamoto, M. E. Gurney, *Journal of Neuroscience* 10, 3469 (1990).
7. F. Karege et al., *Biol. Psychiatry* 57, 1068 (2005).
8. B.-H. Lee, H. Kim, S.-H. Park, Y.-K. Kim, *Journal of Affective Disorders* 101, 239 (2007).
9. E. Shimizu et al., *Biological Psychiatry* 54, 70 (2003).
10. B. Chen, D. Dowlathshahi, G. M. MacQueen, J. F. Wang, L. T. Young, *Biological Psychiatry* 50, 260 (2001).
11. C. A. Altar, R. E. Whitehead, R. Chen, G. Wortwein, T. M. Madsen, *Biol. Psychiatry* 54, 703 (2003).
12. F. Angelucci, L. Aloe, P. Jimenez-Vasquez, A. A. Mathe, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 6, 225 (2003).
13. O. Schulte-Herbruggen et al., *Experimental Neurology* 204, 307 (2007).
14. K. Toyooka et al., *Psychiatry Research* 110, 249 (2002).
15. C. Laske et al., *Journal of Psychiatric Research* 41, 387 (2007).
16. BDNF protokol. BDNF protokol. 6-26-2007. <http://www.promega.com/tbs/tb257/tb257.pdf> Ref Type: Internet Communication
17. G. Yadid et al., *Progress in Neurobiology* 62, 353 (2000)
18. GraphPad Prism 5.00. 2007. Ref Type: Computer Program
19. Johansen K., *Basal sundhedsvidenskabelig statistik- begreber og metode* (Munksgaard Danmark, København, ed. 1. udgave, 1. oplag, 2007).
20. H. Fujimura et al., *Thrombosis and Haemostasis* 87, 728 (2002).
21. Trajkovska V. et al., *Brain Research Bulletin* 73, 143 (7 A.D.).
22. F. Karege, M. Schwald, M. Cisse, *Neuroscience Letters* 328, 261 (2002).
23. S. F. Radka, P. A. Holst, M. Fritsche, C. A. Altar, *Brain Res.* 709, 122 (1996).
24. A. Chiaretti et al., *Acta Paediatrica* 93, 1178 (2004).
25. F. Angelucci, L. Aloe, P. J. Vasquez, A. A. Mathe, *Neuroreport* 11, 1369 (2000).