

mgr farm. Karolina Podkowa  
Promotor: dr hab. Agnieszka Pałucha-Poniewiera  
Zakład Neurobiologii  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

## **Wpływ wybranych ligandów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych na potencjalne przeciwdepresyjne działanie ketaminy i skopolaminy**

### **Streszczenie**

Etiologia zaburzeń depresyjnych pozostaje wciąż nieznana. Epizody depresyjne upośledzają funkcjonowanie w społeczeństwie, prowadzą do zubożenia ekonomicznego, osłabiają więzi rodzinne, a nawet mogą prowadzić do prób samobójczych. Na pierwsze efekty terapeutyczne leków przeciwdepresyjnych, oddziałujących głównie na przekąźnictwo serotoninerdyczne i/lub noradrenergiczne, trzeba czekać wiele tygodni. Ponadto, ich efekt może się okazać niewystarczający m.in. u pacjentów chorujących na depresję lekooporną z tendencjami samobójczymi. Z tego powodu skuteczna farmakoterapia depresji stanowi niewątpliwie jedno z głównych wyzwań stojących przed współczesną psychiatrią.

Wiele prac wskazuje, że ketamina oraz skopolamina wywołują szybkie i długotrwałe działanie przeciwdepresyjne u ludzi. Podobne efekty obie te substancje wykazują w licznych badaniach na zwierzętach. Zarówno ketamina, jak i skopolamina zarejestrowane są już jako leki, jednakże w innych wskazaniach niż depresja, a ich przyjmowanie związane jest z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych m.in. zaburzeń rytmu serca (w przypadku ketaminy), czy pogorszenia pamięci (dla skopolaminy). Stosunkowo niedawno w USA wprowadzono do leczenia depresji enancjomer ketaminy – esketaminę. Substancja ta może poprawić stan zdrowia wielu pacjentów, jednak jej użycie związane jest z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych. Wprowadzenie na rynek esketaminy stanowi alternatywę w leczeniu depresji oraz niewątpliwie dostarczy wiarygodnych danych na temat rzeczywistych efektów, wynikających z jej długotrwałego stosowania.

Inną strategię może stanowić użycie ketaminy lub skopolaminy w niskich, podprogowych dawkach w połączeniu z inną substancją wykazującą efekty przeciwdepresyjne i działającą w oparciu o podobny mechanizm. Na takie podejście zdecydowano się w ramach niniejszej pracy. Połączono niskie dawki (niewykazujące aktywności przeciwdepresyjnej w standardowych testach przedklinicznych) ketaminy lub skopolaminy z niskimi dawkami ligandów II lub III grupy glutaminianergicznych receptorów metabotropowych (mGlu; odpowiednio: LY341495 i AMN082). Wybór ligandów mGlu był podyktowany ich znacznym potencjałem przeciwdepresyjnym, który został wykazany w wielu badaniach na zwierzętach.

Ponadto zaobserwowano istotne podobieństwo mechanizmu ich działania przeciwdepresyjnego do mechanizmu związanego z działaniem ketaminy i skopolaminy, polegającego na modulacji transmisji glutaminianergicznej.

W niniejszej pracy doktorskiej wszystkie testy behawioralne zostały przeprowadzone na samcach szczurów szczepu Sprague Dawley, samcach myszy szczepów C57BL/6J, CD-1 lub samcach myszy transgenicznych (mGlu7<sup>-/-</sup> i mGlu7<sup>+/+</sup>). W celu określenia potencjalnych efektów przeciwdepresyjnych połączeń podprogowych dawek ketaminy lub skopolaminy z wybranymi ligandami receptorów mGlu, wykonano następujące eksperymenty: test zawieszenia za ogon (TST – tail suspension test) oraz test wymuszonego pływania (FST – forced swim test).

Zastosowanie antagonisty receptorów AMPA (NBQX) lub antagonisty receptorów TrkB (ANA-12), umożliwiło zbadanie roli tych receptorów w potencjalnym przeciwdepresyjnym efekcie badanych połączeń substancji, a użycie PCPA – inhibitora hydroksylazy tryptofanu, pozwoliło na sprawdzenie hipotezy, czy obserwowany efekt przeciwdepresyjny zależy od transmisji serotoninerdycznej. Ponadto, zbadano wpływ zastosowanych połączeń substancji na poziom ekspresji wybranych białek synaptycznych, m.in. GluA1 i PSD-95, oraz na stopień aktywacji szlaku mTOR w wybranych strukturach mózgu myszy (hipokamp, kora przedczołowa) przy wykorzystaniu metody Western blot.

Ostatnim etapem badań były eksperymenty dotyczące określenia ryzyka wystąpienia potencjalnych działań niepożądanych badanych połączeń substancji. W tym celu analizowano wpływ badanych połączeń związków m.in. na koordynację zwierząt, aktywność lokomotoryczną oraz na pamięć przestrzenną w labiryncie wodnym Morrisa.

Otrzymane wyniki wskazują na wysoki potencjał terapeutyczny zarówno połączenia ketaminy z LY34145, jak i połączenia skopolaminy z LY341495 lub AMN082 w znoszeniu objawów depresyjnych. Dzięki połączeniu z niskimi dawkami ligandów receptorów mGlu udało się obniżyć dawkę terapeutyczną ketaminy i skopolaminy. Jak wcześniej wspomniano, użycie ketaminy lub skopolaminy w monoterapii związane jest z ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych. Istotną częścią badań było zatem sprawdzenie, czy wywołujące działanie przeciwdepresyjne niskie dawki ketaminy i skopolaminy, podane łącznie z ligandami receptorów mGlu będą wywoływać działania niepożądane, podobne do tych, które obie substancje powodują w monoterapii, w wyższych dawkach. Wykazano, że zastosowanie niskich dawek tych związków w połączeniu z niskimi dawkami ligandów II lub III grupy receptorów mGlu może pozwolić na uniknięcie wielu tych efektów. Badane połączenie ketaminy i LY341495 nie tylko nie wywoływało hiperaktywności, ale także nie zaburzało koordynacji zwierząt w teście pręta obrotowego i nie zmieniało ich podstawowej aktywności lokomotorycznej. Ponadto, podawanie skopolaminy łącznie z LY341495 nie zaburzało pamięci przestrzennej myszy, nie wpływało na aktywność lokomotoryczną zwierząt, a w schemacie podań sześciodniowych nie wystąpiła tolerancja na efekt przeciwdepresyjny. Z kolei badane połączenie niskich dawek skopolaminy i AMN082 nie tylko nie wpływało negatywnie na pamięć przestrzenną myszy, ale zaobserwowano wręcz odwrotną tendencję.

Dodatkowo, podanie badanych substancji nie zmieniało podstawowej aktywności lokomotorycznej zwierząt oraz nie zaburzało koordynacji w teście pręta obrotowego. Powyższe wyniki stanowią interesujący dowód skuteczności zastosowanej strategii łączenia niskich dawek badanych związków.

Następnie zbadano potencjalny mechanizm działania wszystkich badanych połączeń ketaminy lub skopolaminy z wybranymi ligandami receptorów mGlu. Należy podkreślić, że obecnie obowiązujące hipotezy nie dostarczają wystarczających wyjaśnień dotyczących spektakularnie szybkiego i trwałego przeciwdepresyjnego mechanizmu działania ketaminy czy skopolaminy i prawdopodobnie część z nich już wkrótce będzie stanowić zaledwie ciekawy punkt w historii badań neurofarmakologicznych.

Przeprowadzone analizy wskazały, że przeciwdepresyjne działanie połączenia ketaminy i LY341495 może być związane z pobudzeniem receptorów AMPA i aktywacją szlaku kinazy mTOR. Z drugiej strony badania z wykorzystaniem antagonisty receptorów TrkB wykazały, że zablokowanie ich funkcji nie wpływa na obserwowany efekt przeciwdepresyjny w przyjętych schematach czasowych. Z kolei działanie przeciwdepresyjne połączenia skopolaminy i LY341495 zależało od aktywacji receptorów AMPA, podczas gdy blokada syntezy serotoniny nie wpływała na ten efekt. Ponadto, w eksperymentach na myszach transgenicznym pozbawionych receptorów mGlu7 wykazano, że mechanizm działania przeciwdepresyjnego połączenia skopolaminy i AMN082 zależy od tych receptorów. Rezultaty te wymagają rozszerzenia przy użyciu innych dostępnych modeli i testów, m.in. chronicznego łagodnego stresu. Poznanie mechanizmu działania badanych leków może pozwolić na zwiększenie precyzji działania i tym samym zwiększyć skuteczność leczenia depresji.

Otrzymane w ramach niniejszej pracy wyniki pokazują po raz pierwszy potencjalny efekt przeciwdepresyjny połączenia podprogowych dawek ketaminy lub skopolaminy z wybranymi ligandami receptorów mGlu (LY341495 i AMN082). Efektowi temu nie towarzyszą działania niepożądane charakterystyczne dla użycia ketaminy lub skopolaminy w wysokich dawkach. Takie podejście terapeutyczne może stwarzać możliwość skutecznego leczenia depresji, szczególnie u pacjentów, u których standardowe terapie nie przynoszą rezultatów.

## Summary

The aetiology of major depressive disorder (MDD) remains unknown. Depressive episodes impair social functioning, cause economic impoverishment, destroy families, and may lead to suicide attempts.

The first therapeutic effects of antidepressants, acting mainly on serotonergic and/or noradrenergic transmission, occur after many weeks of administration. In addition, their efficacy may be insufficient, especially in patients suffering from the treatment-resistant depression (TRD) with suicidal ideation. Undoubtedly, the effective pharmacotherapy of MDD is one of the main challenges of the modern psychiatry.

Numerous studies indicate that ketamine as well as scopolamine exert fast and long-lasting antidepressant effect in humans. Furthermore, those compounds showed similar effects in animal tests and models used to assess antidepressant potency. Both ketamine and scopolamine have already been registered in the therapy of diseases different than depression. It is worth mentioning that their intake is associated with the occurrence of numerous adverse effects e.g. arrhythmia (ketamine) or memory impairment (scopolamine).

Recently, ketamine enantiomer (esketamine) has been introduced in the USA for the patients suffering from the TRD. This substance can improve the depressive symptoms of many patients, but the use of esketamine might be associated with adverse effects. Availability of esketamine is an alternative to the traditional treatment of depression and would possibly provide reliable data about adverse effects resulting from long-term use.

Another strategy may be using the combination of low, ineffective doses of ketamine or scopolamine combined with metabotropic glutamate (mGlu) receptor ligands (which exert the antidepressant-like effects in several behavioural studies). This approach was implemented in the present doctoral thesis. Low doses of ketamine or scopolamine were combined with low doses of group II or III mGlu receptors ligands: LY341495 or AMN082, respectively.

In the present study, all behavioural tests were performed on male Sprague Dawley rats, C57BL/6J mice, male CD-1 mice or male transgenic mice (mGlu7<sup>-/-</sup> and mGlu7<sup>+/+</sup>). To determine the potential antidepressant effects of combinations of subeffective doses of ketamine or scopolamine with subeffective doses of selected mGlu receptor ligands – the following tests were performed: the tail suspension test (TST) and the forced swim test (FST). Furthermore, the AMPA receptor antagonist – NBQX or TrkB receptors antagonist – ANA-12 was used to study the role of these receptors in the potential antidepressant effect of the tested substances, while the use of PCPA – a tryptophan hydroxylase inhibitor, allowed to check whether the observed antidepressant effect depends on serotonergic transmission. In addition, the effect of the tested combinations of substances, on the level of expression of selected proteins (e.g. GluA1, PSD-95) was analysed and the hypothesis on activation of mTOR pathway was examined by the use of the Western blot method.

The final stage of the study were experiments assessing the risk of potential adverse effects of all tested combinations. In order to examine those effects, the locomotor activity test, rotarod test (assessing motor coordination) the Morris water maze test (assessing spatial memory) were performed.

The obtained results indicate a high therapeutic potential of the joint administration of ketamine with LY341495 as well as scopolamine with LY341495 or AMN082. The antidepressant-like effects of tested drugs have been shown in behavioural tests: FST and/or TST.

As previously mentioned, the use of ketamine or scopolamine in monotherapy is associated with the risk of serious adverse effects. Therefore, it was important to verify whether low doses of ketamine and scopolamine, administered jointly with the mGlu receptor ligands, would evoke negative effects characteristic of the sole use of ketamine or scopolamine.

First, it was found that the administration of ketamine and LY341495 did not induce hyperactivity, or impair motor coordination of animals in the rotarod test as well as did not change their basic locomotor activity. Secondly, the administration of scopolamine with LY341495 did not affect spatial memory in mice or impair their locomotor activity. Furthermore, no tolerance to the antidepressant-like effect of scopolamine and LY341495 was observed, after sub-chronic administration.

Finally, low doses of scopolamine and AMN082 did not affect the spatial memory of mice, and even the opposite trend was observed. In addition, administration of the tested substances did not change the basic locomotor activity of the animals or disturb the motor coordination in the rotarod test. Above results are an interesting evidence of the effectiveness of the strategy of combining the low, ineffective doses of different compounds.

Finally, the potential mechanism of action of all tested substances was investigated. It should be emphasized that the current hypotheses do not provide enough explanations for the profoundly fast as well as long-lasting antidepressant effects of ketamine or scopolamine. Probably some of them will be just an interesting point in the history of neuropharmacological research.

In the present doctoral thesis, it was shown that the antidepressant effects of the combination of ketamine and LY341495 might be associated with stimulation of AMPA receptors and the activation of the mechanistic target of rapamycin – mTOR kinase pathway. On the other hand, studies using the TrkB receptor antagonist have shown that blocking of their function did not influence the antidepressant effect.

Additionally, the antidepressant effect of low doses of scopolamine and LY341495 depended on the activation of AMPA receptors, while the blockade of serotonin synthesis did not affect this effect. The experiments with the use of transgenic mice lacking mGlu7 receptors provided data that the mechanism of the antidepressant effect of scopolamine and AMN082 depended on the mGlu7 receptors. These results should be extended using other test and models of depression, including, e.g., chronic mild stress. Understanding the mechanism of action

of the tested drugs may increase the precision of action and increase the effectiveness of MDD treatment.

To summarize, the obtained results showed for the first time the antidepressant-like effects of low, ineffective doses of ketamine or scopolamine combined with ligands of mGlu receptors. The potential antidepressant effect was not accompanied by adverse effects characteristic of the use of ketamine or scopolamine in monotherapy (in higher doses). This therapeutic approach might enhance the effectiveness of treatment of depression, especially in the group of patients suffering from the TRD, with suicidal ideation, in whom standard therapies are insufficient.