

Zakład Farmakologii Uzależnień
mgr Joanna Jastrzębska

Tytuł pracy doktorskiej:

„Wpływ leków przeciwdepresyjnych na uzależniające działanie kokainy u zwierząt z doświadczalną depresją”

Promotor: Prof. dr hab. Małgorzata Filip

Promotor pomocniczy: dr Małgorzata Frankowska

STRESZCZENIE

Dane epidemiologiczne i kliniczne wskazują na wysoki wskaźnik współwystępowania depresji i uzależnienia od substancji psychoaktywnych. Częstość współwystępowania depresji i uzależnienia od kokainy wynosi od 30 do 60%. Neurologiczne podłoże depresji i uzależnienia od psychostymulantów wiąże się z odmiennymi mechanizmami i w dużym stopniu współzależność między nimi jest związana z czasem pojawiania się któregoś z tych zaburzeń. Pierwotnie występujące zaburzenia depresyjne, mogą prowadzić do przyjmowania substancji psychostymulującej (np. kokainy) w celu „samoleczenia” objawów depresji. Natomiast długotrwałe ich stosowanie może prowadzić do uzależnienia i większej podatności na zaburzenia depresyjne w okresie abstynencji. Neurobiologiczne podłoże tej hipotezy opiera się na deficytach w dopaminie (DA), noradrenalinie (NA) i serotoninie (5-HT) u osób cierpiących na depresję. Kokaina przez swój mechanizm działania powoduje tymczasową poprawę samopoczucia u chorej osoby. Badania kliniczne i badania środowiskowe potwierdziły, że uzależnienie od substancji psychoaktywnych bardzo często poprzedzone jest występowaniem symptomów dużej depresji. Leczenie współwystępującej depresji i uzależnienia od kokainy stwarza wiele trudności np. niepożądane interakcje między lekami, oraz lekami i substancjami uzależniającymi. Takie interakcje mogą prowadzić do obniżenia skuteczności działania leków przeciwdepresyjnych i zwiększyć ryzyko działań niepożądanych lub nasilić toksyczność leków i środków uzależniających.

Opracowano wiele modeli zwierzęcych do badania zaburzeń depresyjnych i uzależnienia od substancji psychoaktywnych, ale mają one pewne ograniczenia i nie zawsze odzwierciedlają pełny obraz choroby. Najczęściej stosowanym eksperymentalnym zwierzęcym modelem depresji do badania współwystępowania tego zaburzenia i uzależnienia od substancji psychostymulujących jest model usunięcia opuszek węchowych u szczurów (bulbektomia; OBX). Zwierzęta OBX jako model doświadczalny spełniają wszystkie kryteria

dobrego modelu zwierzęcego.

Liczne badania potwierdzają udział receptorów 5-HT_{2C} w mechanizmie zmian obserwowanych zarówno w depresji jak i uzależnieniu od substancji psychostymulujących i mogą odgrywać kluczową rolę w nowych terapiach.

Przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej było poszerzenie wiedzy na temat współwystępowania zaburzeń depresyjnych i uzależnienia od kokainy, wyjaśnienie udziału w nich receptorów 5-HT_{2C} oraz ocena skuteczności leków przeciwdepresyjnych i nowych związków o potencjalnych efektach przeciwdepresyjnych w zwierzęcym modelu tych dwóch patologii. W pierwszej części pracy dokonano charakterystyki dwóch zwierzęcych modeli depresji (szczury z depresją genetyczną - Wistar Kyoto (WKY) i szczury z depresją nabytą - OBX). Zastosowano test wymuszonego pływania i test aktywności lokomotorycznej, następnie analizowano tkankowy poziom neuroprzekazników i ich metabolitów w wybranych strukturach mózgu szczurów WKY i OBX z wykorzystaniem technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną (HPLC/EC) oraz chromatografii cieczowej ze spektrometrią masową (LC-MS/MS). W modelu dożylnego samopodawania kokainy określono zmiany w jej samopobieraniu przez zwierzęta WKY i OBX, a ostatnim etapem charakterystyki zwierzęcego modelu współwystępowania depresji i uzależnienia od kokainy było określenie poziomu ekspresji białka receptorów 5-HT_{2C} z użyciem techniki Western blot w wybranych strukturach mózgu szczurów OBX po samopodawaniu kokainy i po okresie wygaszenia reakcji instrumentalnej. Podczas badań neurochemicznych wykazano odmienne podstawowe poziomy tkankowe DA, NA, 5-HT oraz ich metabolitów w grupie zwierząt OBX i WKY. W modelu dożylnego samopodawania kokainy szczury OBX wykazywały takie same predyspozycje do pobierania kokainy jak w grupie SHAM, ale zwierzęta te wymagały większej liczby sesji (dni) w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, aby wygasić reakcję instrumentalną. Szczury OBX charakteryzowały się silniejszym nawrotem zachowań poszukiwawczych kokainy po prezentacji bodźca warunkowego jak i bezwarunkowego w porównaniu do szczurów SHAM. Natomiast w grupie szczurów WKY zaobserwowano jedynie obniżoną liczbę naciśnień na dźwignię „aktywną” w czasie samopodawania kokainy przy współczynniku wzmocnienia (FR1) i stałej dawce kokainy (0,5 mg/kg/infuzje). W czasie wygaszania reakcji instrumentalnej i nawrotu zachowań poszukiwawczych kokainy nie zaobserwowano różnic między zwierzętami WKY i grupą kontrolną. Po okresie wygaszenia reakcji instrumentalnej (10 dni) u zwierząt OBX nastąpił znaczny wzrost ekspresji białka receptorów 5-HT_{2C} w grzbietowo-przyśrodkowej części prążkowie. Zmiany behawioralne w modelu samopodawania kokainy i zmiany w

podstawowych tkankowych poziomach ważnych dla uzależnienia od kokainy neuroprzekazników 5-HT, NA i DA u szczurów OBX oraz bardzo charakterystyczne zmiany w ekspresji białka receptorów 5-HT_{2C} wskazują na możliwość stosowania tych zwierząt do badań farmakologicznych.

W drugiej części niniejszej pracy wykonano badania farmakologiczne z wykorzystaniem szczurów OBX i modelu dożylnego samopodawania kokainy. Tutaj badano wpływ leków przeciwdepresyjnych (imipraminy (IMI), escitalopramu (ESC), mirtazapiny (MIR), agomelatyny (AGO)) oraz substancji o potencjalnych efektach przeciwdepresyjnych (N-acetylocysteiny (ACC), amidu N-acetylocysteiny (AD4)), oraz agonistów receptorów 5-HT_{2C} (WAY 60-0175, RO 161503) na właściwości nagradzające kokainy, wygaszanie reakcji instrumentalnej i nawrót zachowań poszukiwawczych kokainy u szczurów OBX i SHAM. Zaobserwowano, że IMI osłabiała właściwości nagradzające kokainy zarówno w grupie SHAM i OBX, natomiast AGO tylko w grupie SHAM. IMI, ESC, MIR oraz AGO po jednorazowych podaniach osłabiała nawrót zachowań poszukiwawczych kokainy w grupie SHAM i OBX, natomiast po wielokrotnych podaniach skuteczność w łagodzeniu nawrotu wykazała jedynie IMI. ACC i AD4 znacząco hamowały nawrót zachowań poszukiwawczych kokainy po jednorazowych podaniach, dodatkowo AD4 osłabiała nawrót do nałogu po podaniach wielokrotnych tak samo efektywnie u szczurów z grupy kontrolnej jak i u zwierząt OBX. Obaj stosowani agoniści receptorów 5-HT_{2C} osłabiali nawrót zachowań poszukiwawczych kokainy po podaniach jednorazowych, a po podaniach wielokrotnych byli skuteczni tylko w przypadku bodźca warunkowego w grupie SHAM, jak i OBX.

Ten ostatni wynik potwierdza istotny udział tych receptorów w nawrotach zachowań poszukiwawczych kokainy zarówno u zwierząt z depresją, jak i u zwierząt tylko uzależnionych od kokainy.

Przeprowadzone w pracy doktorskiej badania przyczyniły się do poszerzenia wiedzy o mechanizmach zaangażowanych w patogenezę depresji ze współwystępującym uzależnieniem od kokainy. Szczególnie podkreślono w nich rolę układu 5-HT-ergicznego i jednego z receptorów dla 5-HT (5-HT_{2C}) w tych dwóch zaburzeniach. Dodatkowo po raz pierwszy kompleksowo scharakteryzowano zwierzęcy model współwystępowania depresji i uzależnienia od kokainy oraz przedstawiono wpływ leków przeciwdepresyjnych i substancji o potencjalnym działaniu przeciwdepresyjnym w tym zwierzęcym modelu doświadczalnym. Uzyskane wyniki wskazują nowe kierunki badań nad depresją i współwystępującym z nią

uzależnieniem od kokainy z uwzględnieniem roli układu 5-HT-ergicznego i receptorów 5-HT_{2C}.

ABSTRACT

Epidemiological and clinical data indicate a high rate of comorbidity between depression and drug addiction. The prevalence of co-occurrence of depression and cocaine dependence ranges from 30 to 60%. As far as the neurobiology of such comorbidity is concerned, different mechanisms may be involved depending on the temporal pattern of its development. Depression followed by drug abuse (e.g. cocaine) may reflect an attempt to self-medicate depression, while drug abuse followed by depression may result from an early exposure to chronic drug abuse, which leads to neurobiological changes increasing the risk of depression. This hypothesis is based on deficits in dopamine (DA), noradrenaline (NA) and serotonin (5-HT). Cocaine by its mechanism of action causes a temporary mood improvement. Clinical and environmental studies have confirmed that addiction to psychoactive substances is very often preceded by symptoms of major depression. Treatment of comorbid depression and cocaine abuse poses many difficulties, for instance undesirable interactions between drugs or between the drug and substance of abuse. Such interactions may decrease efficacy of antidepressants, increase the risk of side effects or aggravate the toxicity of drugs and addictive substances.

There are many animal models of depressive disorders and substance abuse, but they have some limitations and do not reflect the clinical disease. The most frequently used experimental animal model of depression used to study the co-occurrence of this disorder and addiction is the model based on bilateral olfactory bulbectomy (OBX). OBX animals as an experimental model meet all criteria of a good animal model of depression. Numerous studies confirm an important role of 5-HT_{2C} receptors in the mechanism of depression and substance use disorders and they can play a key role in new therapies for coexisting depression and cocaine addiction.

The aim of this study was to broaden the knowledge on the coexistence of depressive disorders and cocaine addiction, to explain the role of 5-HT_{2C} receptors in these phenomena and to assess the effectiveness of antidepressants and new compounds with potential antidepressant effects in the animal model of these two pathologies. In the first part of the study, two animal models of depression were characterized (rats with genetic depression - Wistar Kyoto (WKY) and rats with olfactory bulbs removed - OBX). First, the forced swim

test and locomotor activity test were performed, and then, the basal levels of neurotransmitters and their metabolites were analyzed in selected brain structures of WKY and OBX rats using high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC/EC) and liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS/MS). Using the intravenous cocaine self-administration model, we determined differences in cocaine self-administration between WKY and OBX animals. The final stage of the study was to determine the expression of 5-HT_{2C} receptors in selected brain structures of OBX rats after cocaine self-administration and extinction, with Western blot analysis. Neurochemical studies showed different basal tissue levels of DA, NA, 5-HT and their metabolites in the OBX and WKY rats. In the intravenous cocaine self-administration model, OBX rats exhibited the same predisposition for cocaine self-administered as the SHAM group, but these animals required more sessions (days) compared to control animals to extinguish operant responding. In the WKY rats, we observed the reduced number of "active" lever presses during cocaine self-administration only under a stable dose of cocaine (0.5 mg/kg/infusion) and fixed ratio (FR) schedule 1. There were no differences between the WKY animals and the control group, during extinction and cocaine reinstatement. After the extinction training (10 days) in OBX animals, a significant increase in 5-HT_{2C} receptor expression was observed in the dorsomedial striatum. Behavioral changes in the cocaine self-administration and changes in the basal tissue levels of important neurotransmitters (5-HT, NA and DA) in the cocaine addiction in OBX rats and very characteristic changes in the expression of 5-HT_{2C} receptors indicate the possibility of the use of these animals for pharmacological studies.

In the second part of this study, pharmacological experiments were performed using OBX rats and an intravenous cocaine self-administration model. The effects of antidepressants (imipramine (IMI), escitalopram (ESC), mirtazapine (MIR), agomelatine (AGO)), substances with potential antidepressant effects (N-acetylcysteine (ACC) and N-acetylcysteine amide (AD4)), and 5-HT_{2C} receptors agonists (WAY 60-0175, RO 161503) on cocaine self-administration and extinction/reinstatement procedures were studied in OBX and SHAM rats. It was observed that IMI reduced cocaine-seeking behavior in SHAM and OBX animals, while AGO only in the SHAM group. IMI, ESC, MIR and AGO, after acute administration, attenuated the reinstatement of seeking behavior in SHAM and OBX groups whereas only IMI was efficient after chronic administration. ACC and AD4 administered chronically significantly inhibited the relapse, while AD4 also suppressed cocaine seeking behavior during cocaine priming- or cue –induced reinstatement, and these drugs were equally effective in control and OBX rats. Both 5-HT_{2C} receptor agonists, used in this work,

attenuated the cocaine-seeking after acute administration, but after repeated administrations they were effective only when a conditioned cue was used as the stimulus in the SHAM and OBX groups. The latter results confirm an important contribution of these receptors to cocaine seeking and relapse.

The study in this doctoral thesis contributed to exploration of the mechanisms related to coexisting depression and cocaine addiction. In particular, the results highlighted the role of the 5-HTergic system and one of the 5-HT (5-HT_{2C}) receptor in these two disorders. This is the first study, in which the animal model of the coexisting depression and cocaine addiction was comprehensively characterized. In addition, the effects of antidepressants and substances with potential antidepressant effects in this animal experimental model were presented. We hope that the obtained data may open up new directions for research into co-occurring depression and cocaine addiction with special focus on the role of the 5-HT-ergic system and 5-HT_{2C} receptors.