



AUTOREFERAT

Agnieszka Pałucha-Poniewiera

Zakład Neurobiologii

Instytut Farmakologii PAN

w Krakowie

Kraków 2014

Spis Treści:

1. Dane osobowe.....	3
1.1. Imię i nazwisko.....	3
1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	3
1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
2. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).....	4
2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego.....	4
2.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	4
2.3. Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).....	26
3.1. Dane parametryczne i ilość publikacji.....	26
3.2. Inne realizowane tematy badawcze.....	27
3.3. Prace przeglądowe.....	29
3.4. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową.....	29
3.5. Udział w projektach badawczych oraz programach europejskich i krajowych.....	31
3.6. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych.....	32
3.7. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych....	34
3.8. Aktywny udział w międzynarodowych konferencjach naukowych.....	34

1. Dane osobowe

1.1. *Imię i nazwisko*

Agnieszka Pałucha-Poniewiera

1.2. *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe*

- mgr biologii – Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
14.06.1995 – obrona pracy magisterskiej pt.: „Zmienność sezonowa wymian chromatyd siostrzanych” i uzyskanie tytułu magistra biologii, z wyróżnieniem.

Promotor: dr Jan Schmager

Recenzenci: prof. dr hab. Jerzy Klag
prof. dr hab. Katarzyna Sawicka-Kapusta

- dr n. med. – Instytut Farmakologii PAN w Krakowie
13.11.2003 – obrona pracy doktorskiej pt.: „Rola receptorów metabotropowych dla pobudzających aminokwasów w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych” i uzyskanie tytułu doktora nauk medycznych, specjalność: biologia medyczna, z wyróżnieniem.

Promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej Pilc

Recenzenci: prof. dr hab. n. med. Andrzej Członkowski
prof. dr hab. n. med. Alfons Chodera

1.3. *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych*

- 1995 – 1997 pracownik inż.-techn. w Zakładzie Neurobiologii,
Instytut Farmakologii PAN w Krakowie
- 1997 – 2005 asystent w Zakładzie Neurobiologii,
Instytut Farmakologii PAN w Krakowie
- 2005 – do chwili obecnej adiunkt w Zakładzie Neurobiologii,
Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

2. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pod tytułem:

Potencjalne własności przeciwdepresyjne ligandów glutaminianergicznych receptorów metabotropowych (mGlu) oraz mechanizmy ich działania.

2.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Pałucha A.**, Brański P., Szewczyk B., Wierońska J.M., Kłak K., Pilc A.: Potential antidepressant-like effect of MTEP, a potent and highly selective mGluR5 antagonist. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2005, 81, 901-906. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.06.015.
IF = 1,97
pkt. MNiSW = 20
ilość cytowań = 58
2. **Pałucha-Poniewiera A.**, Brański P, Wierońska JM, Stachowicz K, Sławińska A, Pilc A. The antidepressant-like action of mGlu5 receptor antagonist, MTEP, in the tail suspension test in mice is serotonin dependent. *Psychopharmacology*, 2014, 231, 97-107. DOI: 10.1007/s00213-013-3206-6.
IF = 3,988
pkt. MNiSW = 35
ilość cytowań = 1
3. **Pałucha-Poniewiera A.**, Pilc A. Involvement of mGlu5 and NMDA receptors in the antidepressant-like effect of acamprosate in the tail suspension test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2012. 39, 102-6. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2012.05.015.
IF = 3,552
pkt. MNiSW = 30
ilość cytowań = 4

4. **Pałucha-Poniewiera A**, Wierońska JM, Brański P, Stachowicz K, Chaki S, Pilc A. On the mechanism of the antidepressant-like action of group II mGlu receptor antagonist, MGS0039. *Psychopharmacology*, 2010, 212, 523-35. DOI: 10.1007/s00213-010-1978-5.
IF = 3,817
pkt. MNiSW = 32
ilość cytowań = 23
5. **Pałucha A.**, Kłak K., Brański P., van der Putten H., Flor P.J., Pilc A.: Activation of the mGlu7 receptor elicits antidepressant-like effects in mice. *Psychopharmacology*, 2007, 194, 555-562. DOI 10.1007/s00213-007-0856-2.
IF = 3,561
pkt. MNiSW = 24
ilość cytowań = 59
6. **Pałucha-Poniewiera A**, Brański P, Lenda T, Pilc A. The antidepressant-like action of metabotropic glutamate 7 receptor agonist N,N'-bis(diphenylmethyl)-1,2-ethanediamine (AMN082) is serotonin-dependent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2010,334,1066-1074. DOI: 10.1124/jpet.110.169730.
IF = 4,017
pkt. MNiSW = 32
ilość cytowań = 23
7. **Pałucha-Poniewiera A**, Pilc A. A selective mGlu7 receptor antagonist MMPIP reversed antidepressant-like effects of AMN082 in rats. *Behav. Brain Res.*, 2013, 238, 109-112. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.10.004.
IF = 3,391
pkt. MNiSW = 30
ilość cytowań = 3
8. **Pałucha-Poniewiera A**, Szewczyk B, Pilc A. Activation of the mTOR signaling pathway in the antidepressant-like activity of the mGlu5 antagonist MTEP and the mGlu7 agonist AMN082 in the FST in rats. *Neuropharmacology*, 2014, 82, 59-68. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.03.001.
IF = 4,819
pkt. MNiSW = 40
ilość cytowań = 0

2.3. Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Poszukiwanie nowych leków przeciwdepresyjnych (LPD) jest jednym z kluczowych celów badań z dziedziny psychofarmakologii. Leki stosowane aktualnie w terapii depresji są zaledwie niewielką modyfikacją przypadkowo odkrytych w latach 50-tych ubiegłego stulecia LPD, których mechanizm działania opiera się o modyfikację przekaźnictwa monoaminergicznego. Leki te są mało skuteczne (lekooporność w przypadku leczenia klasycznymi LPD ocenia się aktualnie na około 60%), a czas oczekiwania na efekt terapeutyczny wynosi co najmniej kilka tygodni (Fekadu i wsp., 2009). Mimo intensywnych badań nad klasycznymi LPD oraz szeroko pojętą patofizjologią tej choroby, obserwuje się stale rosnącą liczbę chorych na depresję (w krajach wysoko rozwiniętych choruje już 17%-20% populacji)(Wittchen i wsp., 2011). Biorąc pod uwagę fakt, że depresja nie jest tylko problemem klinicznym, ale również społecznym i ekonomicznym, znalezienie nowego LPD, działającego szybko i skutecznie jest jedną z najpilniejszych potrzeb neuropsychiatrii i neurofarmakologii.

Glutaminianergiczna hipoteza depresji

Aktualnie, jednym z najbardziej obiecujących kierunków badań nad poszukiwaniem nowych LPD są badania dotyczące układu glutaminianergicznego, będącego głównym układem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). W latach 90-tych ubiegłego stulecia ukazała się seria prac biochemicznych, elektrofizjologicznych i behawioralnych z wykorzystaniem gryzoni, które udowodniały wpływ wielokrotnych podań klasycznych LPD oraz wielokrotnych elektrowstrząsów (ECS) na osłabienie funkcji glutaminianergicznego receptora NMDA (Nowak i wsp., 1998; Paul i wsp., 1993; Skolnick i wsp., 1996). Co więcej, wykazano potencjalne przeciwdepresyjne działanie funkcjonalnych antagonistów tego receptora (np. AP-7, MK-801, ACPC, CGP 37849, CGP 39551, memantyny, eliprodilu, cynku, magnezu) w testach przesiewowych służących do oceny działania przeciwdepresyjnego oraz w zwierzęcych modelach depresji (prace przeglądowe: Skolnick, 1999; Szewczyk i wsp., 2012) Przedstawione powyżej wyniki badań dały podstawę do stworzenia glutaminianergicznej hipotezy depresji, będącej modyfikacją i rozszerzeniem teorii mówiącej o roli czynników troficznych w powstawaniu depresji i mechanizmie

działania LPD. Teoria glutaminianergiczna zakłada, że wielokrotne podania LPD, w procesie zależnym od aktywacji neurotroficznego czynnika mózgowego BDNF, prowadzą w konsekwencji do osłabienia funkcji receptora NMDA, a zatem kierunek działania klasycznych LPD oraz antagonistów receptora NMDA, znanych ze swych przeciwdepresyjnych własności, jest wspólny. Opisana w 1999 roku przez profesora Philla Skolnicka glutaminianergiczna hipoteza depresji dawała wielkie nadzieje na odkrycie nowych LPD, czego wyrazem jest tytuł pracy proponującej tę hipotezę: „Antidepressants for the new millenium” (Skolnick, 1999).

Spektakularnym zwieńczeniem tych badań okazały się prowadzone w ostatnich latach eksperymenty kliniczne, które wykazały, że antagonistą NMDA, ketamina, podana jednorazowo, dożylnie, pacjentom cierpiącym na nawracającą depresję lekooporną, wywołuje działanie przeciwdepresyjne, które pojawia się bardzo szybko (już po 2 godzinach od podania) oraz utrzymuje się przez kilka dni (Berman i wsp., 2000; Zarate i wsp., 2006). Porównywalną skuteczność ketaminy potwierdzają liczne badania kliniczne, w tym dotyczące pacjentów cierpiących na depresję dwubiegunową oraz opornych na leczenie elektrowstrząsami (Diazgranados i wsp., 2010; Ibrahim i wsp., 2011). Znaczenie tych prac jest o tyle doniosłe, że zaprzeczają one istniejącemu od dziesięcioleci przekonaniu, iż wywołanie efektu terapeutycznego w leczeniu depresji musi poprzedzać kilkutygodniowa terapia farmakologiczna wywołująca powolne zmiany adaptacyjne w określonych strukturach mózgu. Okazuje się, że efekt terapeutyczny można osiągnąć już kilka godzin po jednorazowym podaniu leku. Niewątpliwie mechanizm działania ketaminy różni się od mechanizmu działania klasycznych LPD działających w oparciu o modulację układów monoaminergicznych. Zbadanie tego mechanizmu jest jednym z kluczowych zadań współczesnej neuropsychiatrii.

Mimo, iż efekt działania ketaminy jest spektakularny, sam lek ma zbyt wiele ograniczeń, aby mógł być stosowany w terapii depresji (dożylna droga podania pod nadzorem anestezjologa uniemożliwia stosowanie go w leczeniu ambulatoryjnym, ponadto w wyższych dawkach ketamina wywołuje efekty psychotyczne, ma działanie nasenne i może być lekiem niebezpiecznym dla życia) (Blier i wsp., 2012; Krystal i wsp., 2013). Liczne efekty niepożądane dotyczą również innych antagonistów NMDA, zwłaszcza blokerów kanału receptora NMDA (Sanacora i wsp., 2013). Natomiast, wyniki klinicznych badań wskazujących na szybkie i długotrwałe działanie

przeciwdepresyjne ketaminy dają olbrzymią nadzieję na znalezienie nowego LPD spośród substancji wpływających na modulację przekazywania glutaminianergicznego.

Glutaminianergiczne receptory metabotropowe i ich rola w mechanizmie działania LPD

Nowe możliwości w zastosowaniu modulatorów układu glutaminianergicznego jako potencjalnych leków otworzyło odkrycie glutaminianergicznych receptorów metabotropowych (mGlu) (Nakanishi, 1992). Rodzina receptorów mGlu składa się z 8 podtypów (mGlu1 – mGlu8) i tworzy 3 grupy, zgodnie z homologią sekwencji i profilem farmakologicznym. Grupa I zawiera receptory mGlu1 i mGlu5, grupa II obejmuje receptory mGlu2 i mGlu3, natomiast do grupy III należą receptory mGlu4, mGlu6 (w mózgu praktycznie nieobecny) oraz mGlu7 i mGlu8 (Conn i Pin, 1997). W odróżnieniu od ligandów receptorów iGlu, odpowiadających za szybkie efekty pobudzenia, ligandy mGlu, odpowiadają za jego wolniejszą modulację (Conn i Pin, 1997). Dlatego też są poważnie brane pod uwagę jako potencjalne skuteczne, a zarazem bezpieczniejsze od ligandów iGlu, leki stosowane w terapii różnych chorób OUN.

Badania nad zastosowaniem ligandów mGlu w depresji są prowadzone od lat 90-tych XX wieku. Zespół Zakładu Neurobiologii Instytutu Farmakologii PAN, pod kierunkiem profesora Andrzeja Pilca, do którego dołączyłam w roku 1995, prowadził pionierskie na skalę światową badania w tym zakresie, a rola receptorów mGlu w mechanizmie działania LPD stała się przedmiotem moich badań zakończonych doktoratem w 2003 roku. Wykazaliśmy wówczas, że wybrane LPD oraz elektrowstrząsy wywołują osłabienie wrażliwości receptorów I grupy mGlu u szczurów (Pałucha i wsp., 1997; Pilc i wsp., 1998). Ponadto, jako pierwsi na świecie wykazaliśmy potencjalne działanie przeciwdepresyjne ligandów receptorów mGlu. Większość substancji podawaliśmy wówczas do komór bocznych mózgu (*i.c.v.*), gdyż nie miały one zdolności penetrowania bariery krew-mózg. Wykazaliśmy m.in. potencjalną przeciwdepresyjną aktywność podanych *i.c.v.* ligandów III grupy mGlu (Pałucha i wsp., 2004). Najważniejszym osiągnięciem w tamtym okresie, które otworzyło całą serię badań prowadzonych na całym świecie, było natomiast wykazanie potencjalnych własności przeciwdepresyjnych biodostępnego po podaniach obwodowych negatywnego modulatora allosterycznego (NAM) receptora mGlu5, 2-metylo-6-(fenyletynylo)-pirydyny (MPEP), w testach behawioralnych u myszy i szczurów, a praca mojego współautorstwa pt. "Potential anxiolytic- and antidepressant-

like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist” opublikowana w British Journal of Pharmacology do dnia dzisiejszego została zacytowana 208 razy (Tatarczyńska i wsp., 2001).

Ze względu na potencjalne zastosowanie kliniczne badanych substancji oraz nowatorstwo zagadnienia, po uzyskaniu stopnia dr n. med., podjęłam kontynuację badań. Skupiły się one na dwóch głównych zagadnieniach:

A/ badanie potencjalnego przeciwdepresyjnego działania nowych, selektywnych, penetrujących barierę krew-mózg ligandów (ortosterycznych i allosterycznych) receptorów mGlu w testach służących do oceny działania przeciwdepresyjnego leków.

B/ badanie mechanizmów przeciwdepresyjnego działania ligandów mGlu.

Wyniki badań zaowocowały powstaniem cyklu prac naukowych dotyczących potencjalnego działania przeciwdepresyjnego ligandów wszystkich trzech grup receptorów mGlu. W dalszej części autoreferatu prace te będą cytowane i omawiane zgodnie z numeracją zastosowaną w pkt. 2.2. autoreferatu. Numery będą umieszczane w okrągłych nawiasach i będą oznaczone pogrubioną czcionką.

Potencjalne działanie przeciwdepresyjne ligandów receptorów mGlu5 (Grupa I receptorów mGlu) i mechanizm ich przeciwdepresyjnego działania

W pierwszej fazie skupiłam się na badaniu potencjalnych własności przeciwdepresyjnych receptorów mGlu5, należących do I grupy receptorów mGlu. Receptory te są powiązane, zarówno przestrzennie jak i funkcjonalnie, z receptorami NMDA. Aktywacja receptorów mGlu5 nasila aktywność receptorów NMDA, zaś blokada receptorów mGlu5 wpływa na osłabienie funkcji receptora NMDA (Attucci i wsp., 2001; Awad i wsp., 2000; Doherty i wsp., 2000). Biorąc pod uwagę własności przeciwdepresyjne antagonistów receptora NMDA, uzasadnione było zbadanie przeciwdepresyjnej aktywności antagonistów receptora mGlu5. Na trafność tego założenia wskazywały również wspomniane wyżej obiecujące wyniki badań dotyczących potencjalnych przeciwdepresyjnych własności substancji MPEP, będącej negatywnym allosterycznym modulatorem receptora mGlu5 (Pilec i wsp., 2002; Tatarczyńska i wsp., 2001). W toku dalszych badań okazało się natomiast, że MPEP nie jest pozbawiony wad jako substancja narzędziowa. Po pierwsze wykazano, że w wyższych stężeniach ma on powinowactwo do transportera noradrenergicznego (Heidbreder et al., 2003), a ponadto ma działanie antagonistyczne wobec receptora NMDA (O’Leary et al., 2000) i jest

pozytywnym allosterycznym modulatorem (PAM) receptora mGlu4 (Mathiesen et al., 2003). Każdy z tych mechanizmów mógł mieć znaczący wpływ na działanie przeciwdepresyjne.

Wykazanie niepełnej selektywności MPEP względem receptora mGlu5 podważyło wnioski mówiące, że jego przeciwdepresyjna aktywność wynika wyłącznie z antagonizmu względem tego receptora. Dlatego w dalszych badaniach zastosowaliśmy nowego wysoce selektywnego negatywnego modulatora allosterycznego receptora mGlu5, substancję o symbolu MTEP (3-[(2-metylo-1,3-thiazolo-4-ylo)etynylo]-pirydyna) (Cosford i wsp., 2003). Wyniki badań, opisane i dyskutowane w pracy nr (1) wskazują, że związek ten wykazuje działanie przypominające działanie LPD w teście zawieszenia za ogon (TST, z ang. tail suspension test) (Steru i wsp., 1985), wykonanym z użyciem myszy C57Bl/6J oraz w modelu depresji polegającym na usunięciu opuszek węchowych (OB, z ang. olfactory bulbectomy) (Kelly i wsp., 1997). MTEP podany jednorazowo drogą dootrzewnową skracał czas bezruchu myszy w teście TST w sposób zależny od dawki, a zastosowany w najwyższej z badanych dawek (3 mg/kg) wywoływał działanie porównywalne z klasycznym LPD, imipraminą, podaną w dawce 20 mg/kg. Z kolei w modelu OB, obserwowaliśmy wpływ substancji MTEP na wywołane usunięciem opuszek węchowych zmiany w zachowaniu zwierząt w dwóch testach behawioralnych: w teście wolnego pola, w którym szczury z usuniętymi opuszkami węchowymi wykazują nasiloną aktywność lokomotoryczną oraz w teście biernego unikania, w którym szczury z usuniętymi opuszkami węchowymi wykazują deficyt w nabieraniu odruchu biernego unikania bodźca awersyjnego. W zastosowanym modelu depresji obserwowaliśmy całkowite zniwelowanie deficytów behawioralnych wywołanych usunięciem opuszek węchowych u szczurów, którym podawano MTEP w dawce 1 mg/kg raz dziennie przez 14 dni. Praca nr (1) zawiera również wyniki eksperymentów, które wskazują na brak aktywności przeciwdepresyjnej MTEP w teście wymuszonego pływania u szczurów (FST, z ang. forced swim test), zwanym również „testem Porsolta”, od nazwiska autora oryginalnej pracy opisującej tą metodę (Porsolt i wsp., 1978), szeroko stosowanym na całym świecie do badań przesiewowych potencjalnych LPD. Późniejsze badania wykazały, że MTEP jest szybko metabolizowany i jego aktywność nie została przez nas uchwyciona 60 min po podaniu dootrzewnowym. W pracy innych badaczy wykazano aktywność przeciwdepresyjną MTEP w teście FST u szczurów 15 min po jego podaniu obwodowym (Belozertseva i wsp., 2007). Nasza późniejsza praca dotycząca mechanizmu przeciwdepresyjnego działania MTEP (8) pokazuje, że substancja ta badana 20 min po

podaniu dootrzewnowym również istotnie zmienia parametry behawioralne standardowo stosowane do oceny przeciwdepresyjnego działania leku, potwierdzając tym samym jego aktywność w teście FST u szczurów. Warto dodać, że zapoczątkowane przez nas badania dotyczące przeciwdepresyjnych własności antagonistów receptora mGlu5 były potwierdzone oraz rozszerzone przez innych badaczy (Belozertseva i wsp., 2007; Hughes i wsp., 2013; Iijima i wsp., 2012; Li i wsp., 2006).

Późniejsze badania dostarczały pewnych przesłanek sugerujących, że mechanizm przeciwdepresyjnego działania MTEP u zwierząt może być związany z aktywnością układu serotonergicznego (Bradbury et al., 2003). Nie ma żadnych danych wskazujących na to, by MTEP działał bezpośrednio na jakikolwiek receptor lub transporter serotonergiczny, stąd powstała hipoteza mówiąca o interakcji układu serotonergicznego i glutamatergicznego na poziomie receptora mGlu5. Postanowiliśmy zatem zbadać, czy w stosowanym przez nas oraz szeroko stosowanym na świecie teście TST, aktywność MTEP jest zależna od aktywności układu serotonergicznego (2). W tym celu zbadaliśmy działanie przeciwdepresyjne MTEP u myszy z obniżonym poziomem serotoniny w mózgu. Zastosowaliśmy dwie alternatywne metody obniżenia poziomu tego neurotransmitera: metodę farmakologiczną polegającą na trzydniowych dootrzewnowych podaniach inhibitora hydroksylazy tryptofanowej (PCPA (para-chlorofenyloalaninę)) (O'Leary i wsp., 2007) oraz metodę nefarmakologiczną polegającą na zastosowaniu trzytygodniowej diety beztryptofanowej (Franklin i wsp., 2012). PCPA był podawany w schemacie stosowanym przez nas wcześniej w innych badaniach, w których wykazaliśmy obniżenie poziomu serotoniny w mózgu pod wpływem PCPA o 77% (6). W badaniach dotyczących przeciwdepresyjnego działania MTEP (2) wykazaliśmy metodą behawioralną, że zastosowany schemat podań PCPA skutecznie zablokował działanie klasycznego LPD, fluoksetyny, stosowanej przez nas jako lek referencyjny w teście TST, wskazując tym samym, że obniżenie poziomu serotoniny było wystarczające, by uniemożliwić działanie substancji, której mechanizm działania opiera się o modulację układu serotonergicznego. MTEP, będący negatywnym modulatorem allosterycznym receptora mGlu5 wywoływał analogiczne efekty: u myszy kontrolnych wykazywał klasyczne działanie przeciwdepresyjne, zaś u myszy z obniżonym farmakologicznie przy użyciu PCPA poziomem serotoniny nie wywoływał takiego efektu. Wyniki powyższych badań wskazują, że serotonina występująca w fizjologicznym stężeniu jest niezbędna do wywołania efektu przeciwdepresyjnego przez MTEP. Zastosowanie diety beztryptofanowej, jako nefarmakologicznej metody

obniżenia poziomu serotoniny w OUN nie przyniosło natomiast oczekiwanych rezultatów. Wprawdzie myszy którym podawano paszę beztryptofanową wykazywały spadek masy ciała, co różniło je od myszy karmionych standardową paszą zbilansowaną, których masa przyrastała w prawidłowy sposób, ale w badaniach behawioralnych zaobserwowaliśmy, że fluoksetyna, zastosowana jako substancja referencyjna, wywoływała działanie przeciwdepresyjne w TST u wszystkich myszy, bez względu na ich dietę. Wydaje się zatem, że mimo stosowania trzytygodniowej diety beztryptofanowej poziom serotoniny w OUN pozostał na tyle wysoki, że umożliwił behawioralne działanie substancji działającej selektywnie w oparciu o modulację stężenia tego neurotransmitera w przestrzeni synaptycznej (fluoksetyny). Wobec braku oczekiwanej aktywności leku referencyjnego w tym modelu, trudno jednoznacznie interpretować wyniki eksperymentów z użyciem MTEP, który podobnie do fluoksetyny, wykazywał aktywność przeciwdepresyjną u myszy karmionych dietą standardową jak i beztryptofanową.

Potwierdzeniem roli układu serotonergicznego w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania MTEP są również wyniki eksperymentów z wykorzystaniem testu TST, wykazujących addytywne działanie MTEP i citalopramu, będącego klasycznym LPD, działającym w oparciu o selektywną blokadę transportera serotonergicznego (2). Obie substancje, podane w niskiej dawce, nie wywołującej aktywności przeciwdepresyjnej w teście TST wywołują efekt przeciwdepresyjny gdy podane są łącznie, co świadczy o podobnym lub wspólnym mechanizmie działania pozwalającym na sumowanie się obu efektów. W omawianej pracy (2) zaprezentowałam również wyniki eksperymentów dotyczących roli poszczególnych receptorów serotonergiczných w przeciwdepresyjnym działaniu MTEP w TST. Spośród czterech zbadanych antagonistów poszczególnych podtypów receptorów serotonergiczných (5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{2A/2C}, 5HT₄), tylko w przypadku antagonisty receptorów 5HT_{2A/2C} – ritanseryny, zaobserwowałam jej wpływ na zablokowanie działania przeciwdepresyjnego MTEP. Pozostałe substancje: antagonist receptoru 5HT_{1A}, WAY 100635, antagonist 5HT_{1B}, SB224289 oraz antagonist 5HT₄, GR125487, nie miały wpływu na aktywność badanego antagonisty mGlu5 w teście TST, co wskazuje, na istotną rolę receptorów 5HT_{2A/2C} w przeciwdepresyjnym działaniu MTEP. Dyskutując uzyskane wyniki zwróciłam uwagę na potencjalne mechanizmy, które mogą odpowiadać za interakcję receptora mGlu5 z układem serotonergicznym, a szczególnie udokumentowany we wcześniejszych badaniach wpływ MTEP na wzrost uwalniania serotoniny w korze czołowej szczura po podaniach obwodowych (Stachowicz i wsp. 2007), interakcję

pomiędzy receptorami mGlu5 i 5HT_{2A} na poziomie wtórnych przekaźników informacji komórkowej (Molinaro i wsp., 2009) oraz ewentualnej dimeryzacji 5HT_{2A}/mGlu5, analogicznej do bogato udokumentowanej dimeryzacji receptorów 5HT_{2A}/mGlu2 (González-Maeso i wsp, 2008).

Mimo udowodnionych w badaniach przedklinicznych potencjalnych własności terapeutycznych antagonistów mGlu5, istnieją również dane mówiące o możliwości występowania efektów niepożądanych (np. działań propsychotycznych, zaburzeń kognitywnych) (Pałucha i Pilc, 2007). Większość danych dotyczących działań niepożądanych pochodzi z badań przedklinicznych. Wyników badań klinicznych jest zbyt mało by wyciągać jednoznaczne wnioski. Natomiast, w toku badań naukowych wykazano, że substancja znana i stosowana od kilkadziesiąt lat w celu zmniejszenia objawów odstawienia od alkoholu, akamprozat, opisywana jako lek działający na układ GABA-ergiczny, jest w istocie antagonistą receptora NMDA i/lub receptora mGlu5 (Harris i wsp., 2002). Biorąc pod uwagę, iż jest to lek dobrze tolerowany przez pacjentów, stosujących go w długotrwałej terapii (Boothby i Doering, 2005), postanowiłam zbadać jego potencjalne efekty przeciwdepresyjne w teście TST u myszy oraz sprawdzić mechanizm tego działania z użyciem metod behawioralnych (3). Akamprozat podany myszom C57BL/6J, 60 min przed testem, spowodował istotne statystycznie i zależne od dawki skrócenie czasu bezruchu myszy w teście TST, co w powiązaniu z jego równoczesnym wpływem na obniżenie aktywności badanej w teście aktywności lokomotorycznej myszy, silnie wskazuje na potencjał przeciwdepresyjny tej substancji. Wykazałam również, że efekt działania akamprozatu nie był blokowany przez antagonistę receptora GABA_A, flumazenil, sugerując tym samym brak zaangażowania receptora GABA_A w przeciwdepresyjnym działaniu badanej substancji. Efekt działania akamprozatu był natomiast zniwelowany u myszy, którym podano antagonistę receptora mGlu5 (CDPPB) oraz u myszy, którym podano NMDA (w dawce 25 mg/kg, która nie wywoływała działań niepożądanych w postaci: drgawek, tremoru, ptozy, czy zmian aktywności lokomotorycznej) (3). Dyskutując uzyskane wyniki wskazałam na przypuszczalny mechanizm działania akamprozatu, który prawdopodobnie polega na zablokowaniu receptora mGlu5, a następnie na wtórnej blokadzie receptora NMDA, co prowadzi w konsekwencji do działania przeciwdepresyjnego. Istnienie funkcjonalnych powiązań tego typu, pomiędzy wspomnianymi receptorami, polegających na osłabieniu funkcji receptora NMDA poprzez zablokowany z użyciem antagonisty receptor mGlu5, jest zjawiskiem znanym i dobrze udokumentowanym, o czym wcześniej wspominałam

(praca przeglądowa: Szewczyk i wsp., 2012). Wydaje się, że aktywność przeciwdepresyjna akamprozatu nie może wynikać z niezależnego działania tej substancji na receptor NMDA i receptor mGlu5, bo jego aktywność w teście TST byłaby tylko częściowo blokowana przez odpowiedni dla każdego z tych receptorów ligand (czyli NMDA, CDPPB). Tymczasem obserwujemy całkowitą blokadę aktywności przeciwdepresyjnej akamprozatu przy użyciu każdego z tych ligandów zastosowanych pojedynczo. Ewentualne zastosowanie akamprozatu w terapii depresji wymaga oczywiście badań klinicznych i na podstawie prostych badań behawioralnych z użyciem myszy nie może być przesądzone, aczkolwiek są one ważną przesłanką istnienia takiego potencjału.

Potencjalne działanie przeciwdepresyjne ligandów receptorów mGlu2/mGlu3 (Grupa II receptorów mGlu) i mechanizm ich przeciwdepresyjnego działania

Tematem kolejnych badań była aktywność przeciwdepresyjna ligandów II grupy receptorów mGlu. Zagadnienie to zostało podjęte po raz pierwszy przez grupę japońskich naukowców pod kierunkiem profesora Shigeyuki Chaki, z którym w późniejszym okresie podjęliśmy współpracę naukową. W badaniach przesiewowych grupa profesora Chaki wykazała aktywność przeciwdepresyjną dwóch antagonistów receptorów mGlu2/mGlu3, substancji oznaczonych symbolami: MGS0039 (kwas (1R, 2R, 3R, 5R, 6R)-2-Amino-3-(3,4-dichlorobenzylloksy)-6-fluorobicyklo[3.1.0]heksano-2,6-dikarboksylowy) i LY 341495 (kwas (2S)-2-Amino-2-[(1S,2S)-2-karboksycykloprop-1-ylo]-3-(ksant-9-ylo)propanowy). Silny i zależny od dawki efekt działania obu substancji wykazano w testach TST i FST u myszy (Chaki i wsp., 2004; Karasawa i wsp., 2005) oraz w teście wyuczonej bezradności (Yoshimizu i wsp., 2006). Wykazano również, że MGS0039 podawany myszom przez 2 tygodnie nasilał proliferację komórek w hipokampie dorosłych zwierząt (Yoshimizu i Chaki, 2004), co w kontekście teorii mówiącej o roli neurogenezy w mechanizmie działania LPD może stanowić kolejną przesłankę wskazującą na potencjał przeciwdepresyjny tej substancji. W naszym laboratorium postanowiliśmy kontynuować oraz rozszerzyć badania antagonistów II grupy receptorów mGlu pod kątem ich potencjalnego działania przeciwdepresyjnego. Substancję MGS0039 zastosowaliśmy w modelu depresji polegającym na usunięciu opuszek węchowych (OB), w którym wykazaliśmy wpływ wielokrotnych podań MGS0039 (przez 14 dni) na wywołane usunięciem opuszek węchowych zmiany w nabywaniu odruchu biernego unikania oraz nasiloną aktywność lokomotoryczną mierzoną w teście wolnego pola (4). W przypadku

obu badanych parametrów behawioralnych MGS0039 wywoływał działanie porównywalne z chronicznie podawaną amitryptyliną, która, jako klasyczny LPD została użyta jako lek referencyjny (4).

Drugim badaniem w pracy nr (4) zagadnieniem była rola układu serotonergicznego w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania antagonistów receptorów grupy II mGlu: MGS0039 oraz LY341495. Na istnienie takiej zależności wskazywały badania dotyczące wpływu tych substancji na stymulację aktywności neuronów serotonergicznego jądra grzbietowego szwu i podniesienie stężenia serotoniny w korze przedczołowej szczurów *in vivo*, co potencjalnie może decydować o przeciwdepresyjnym działaniu antagonistów receptorów grupy II mGlu (Karasawa i wsp., 2005; Kawashima i wsp., 2005). W naszych badaniach (4) postanowiliśmy sprawdzić czy fizjologiczne stężenie serotoniny w mózgu myszy jest warunkiem występowania efektu przeciwdepresyjnego związku MGS0039 oraz czy antagoniści receptorów serotonergicznego mają wpływ na działanie przeciwdepresyjne zarówno MGS0039 jak i LY 341495. Stosując wspomniany uprzednio farmakologiczny model obniżenia poziomu serotoniny w mózgu, polegający na trzydniowych podaniach PCPA, będącego inhibitorem hydroksylazy tryptofanowej, wykazaliśmy, że citalopram, zastosowany jako referencyjna substancja działająca selektywnie w oparciu o modulację układu serotonergicznego (ściślej blokadę transportera serotonergicznego) nie wywołuje działania przeciwdepresyjnego u myszy, którym uprzednio podawano PCPA, podczas gdy wywołuje silny efekt przeciwdepresyjny, u myszy kontrolnych. W przypadku MGS0039 (3 mg/kg) nie zaobserwowaliśmy takiej zależności. Mimo stosowania identycznego schematu podań PCPA, MGS0039 wywoływał bardzo silny efekt przeciwdepresyjny, co wskazuje na fakt, iż silnie obniżony poziom serotoniny nie miał wpływu na aktywność przeciwdepresyjną tej substancji. Ponadto wykazaliśmy, że żaden z badanych antagonistów receptorów serotonergicznego (WAY100635- antagonist 5HT_{1A}, ritanseryna-antagonista 5HT_{2A/2C}) nie miał wpływu na osłabienie aktywności przeciwdepresyjnej MGS0039 (3 mg/kg). Podobny wynik uzyskaliśmy stosując drugiego antagonistę receptorów grupy II mGlu, substancję LY 341495. Jej działanie przeciwdepresyjne w teście TST nie zmieniało się w obecności WAY100635, ritanseryny i metergoliny, wykazującej antagonizm względem wielu receptorów serotonergicznego (m.in. 5HT₁, 5HT₂, 5HT_{1D}, 5HT₆ i 5HT₇). Biorąc pod uwagę teorię mówiącą o nasileniu działania terapeutycznego klasycznych LPD poprzez współpodawanie antagonistów receptora 5HT_{1A} (Artigas i wsp., 1996), postanowiliśmy również zbadać wpływ podań

antagonisty tego receptora (WAY100635) na aktywność MGS0039 zastosowanego w teście TST w dawce podprogowej 0,3 mg/kg, celem zbadania ewentualnego nasilenia działania tej substancji. Wyniki wskazują jednoznacznie na brak takiego nasilenia. Podsumowując, wyniki wszystkich wykonanych eksperymentów przeczą teorii, iż przeciwdepresyjne działanie antagonistów receptorów grupy II mGlu w teście TST jest zależne od aktywności układu serotonergicznego. Wykazaliśmy natomiast, potwierdzając tym samym wcześniej publikowane dane innych autorów (Karasawa i wsp., 2005; Koike i wsp., 2011), że działanie przeciwdepresyjne MGS0039 jest skutecznie blokowane przez podanie antagonisty receptora AMPA, substancję o symbolu NBQX, co wskazuje, że mechanizm działania antagonisty receptorów grupy II mGlu jest zależny od aktywności receptora AMPA (4).

Potencjalne działanie przeciwdepresyjne ligandów receptorów mGlu7 (Grupa III receptorów mGlu) i mechanizm ich przeciwdepresyjnego działania

Niezależnym torem przebiegały badania dotyczące potencjalnych własności przeciwdepresyjnych ligandów III grupy receptorów mGlu, najliczniejszej z wszystkich i zawierającej cztery podtypy receptora: mGlu4, mGlu6, mGlu7 i mGlu8 (Conn i Pin, 1997). Pierwsze prace na ten temat podjęłam jeszcze w trakcie realizacji badań będących częścią mojej pracy doktorskiej. Eksperymenty te oparte były wyłącznie o podania ago- i antagonistów receptorów III grupy mGlu do komór bocznych mózgu szczura (*i.c.v.*), gdyż selektywne ligandy poszczególnych podtypów receptorów mGlu4/mGlu7/mGlu8, penetrujące barierę krew-mózg nie były wówczas dostępne. Uzyskane wyniki wskazywały, że dwie substancje o symbolach ACPT-I (niselektywny agonista receptorów III grupy mGlu) i RS-PPG (agonista receptora mGlu8) wywoływały efekt przeciwdepresyjny w teście FST u szczurów (Pałucha i wsp., 2004). Kontynuacja badań była uzależniona od dostępności selektywnych ligandów poszczególnych podtypów receptorów mGlu. Badacze poszukujący tych substancji napotkali jednak na duży problem związany z wysoką zgodnością sekwencji aminokwasowej i struktury przestrzennej kieszeni wiążącej glutaminian, znajdującej się w domenie zewnątrzkomórkowej wszystkich receptorów należących do III grupy mGlu (Lavreysen i Dautzenberg, 2008). Wiązało się to z trudnością w znalezieniu selektywnych ligandów ortosterycznych, czyli takich które wiążą się w miejscu wiązania endogennego liganda. Udało się natomiast znaleźć i zsyntetyzować kilka substancji, które modulują receptory III grupy mGlu poprzez aktywację lub blokadę miejsc allosterycznych tych receptorów.

W związku z dostępnością nowych narzędzi farmakologicznych postanowiłam kontynuować badania dotyczące potencjalnych własności przeciwdepresyjnych ligandów receptorów III grupy mGlu. Zastosowałam m.in. pierwszego selektywnego pozytywnego modulatora allosterycznego receptora mGlu7, substancję o symbolu AMN082 (N,N'-Bis (Difenylmetylo)-1,2-Etanodiamina) (Mitsukawa i wsp., 2005). Badanie receptorów mGlu7 wydawało się szczególnie istotne, gdyż są one gęsto rozmieszczone w strukturach mózgu związanych z procesami emocjonalnymi i motywacyjnymi (kora mózgowa, jądro migdałowe, hipokamp) (Kinoshita i wsp., 1998) i pełnią rolę głównych glutaminianergicznych autoreceptorów, decydujących o poziomie glutamianianu w przestrzeni synaptycznej (Cartmell i Schoepp, 2000).

Nasze badania wykazały, iż AMN082 podany dootrzewnowo myszom C57BL/6J wywoływał zależny od dawki i istotny statystycznie efekt przeciwdepresyjny w teście TST oraz podobny efekt w teście FST u myszy CD1 (5). Wykorzystując w badaniach myszy pozbawione genu receptora mGlu7 (KO, z ang. knock-out) wykazaliśmy ponadto, że przeciwdepresyjny efekt działania AMN082 jest zależny od aktywacji receptora mGlu7, gdyż dotyczy on wyłącznie myszy posiadających ten receptor (WT, z ang. wild type), natomiast nie pojawia się u myszy KO mGlu7. Nasze badania wykazały również, że klasyczny LPD imipramina wykazuje działanie przeciwdepresyjne zarówno u myszy WT mGlu7, jak i u KO mGlu7, wskazując tym samym na odrębny mechanizm działania obu substancji oraz na niezależność działania trójcyklicznego LPD takim jest imipramina od receptora mGlu7 (5). Istotną częścią badań był pomiar aktywności lokomotorycznej wszystkich grup eksperymentalnych, który wykazał, iż myszy KO mGlu7 charakteryzuje nasilona aktywność lokomotoryczna w porównaniu do myszy WT mGlu7 uzyskanych z tego samego miotu, a ponadto wykazaliśmy, że badany agonista receptorów mGlu7, AMN082, istotnie obniża aktywność lokomotoryczną zarówno u myszy WT jak i KO mGlu7, co sugerowało, iż badana substancja nie jest selektywna względem receptora mGlu7. Ten prosty eksperyment behawioralny opublikowany w pracy (5) po raz pierwszy podważył selektywność substancji AMN082, opisywanej jako pierwszy wysoce selektywny PAM receptora mGlu7. Późniejsze prace innych autorów potwierdziły moje obserwacje, a badania Sukoff Rizzo i wsp. (2011) wykazały, że jeden z metabolitów AMN082, substancja N-benzhydryletano-1,2-diamina jest mieszanym inhibitorem transporterów serotoninerdycznego, noradrenergicznego i dopaminergicznego. Taki profil farmakologiczny może mieć istotne znaczenie dla pojawienia się efektu przeciwdepresyjnego wywoływanego przez AMN082, co z kolei może podważać rolę

receptora mGlu7 w tym działaniu. Ponieważ żaden inny agonista receptoramGlu7 nie był dostępny postanowiłam zbadać mechanizm przeciwdepresyjnego działania substancji AMN082, aby jednoznacznie określić rolę receptora mGlu7 w tym procesie.

Wyniki badań zawartych w pracy nr (6) wskazują, że działanie przeciwdepresyjne agonisty receptora mGlu7, substancji AMN082, związane jest aktywnością układu serotonergicznego. Po pierwsze związek ten nie wykazuje aktywności przeciwdepresyjnej w teście TST u myszy C57BL/6J z farmakologicznie obniżonym poziomem serotoniny w mózgu. Wykazaliśmy że stosowany przez nas schemat podać PCPA powoduje obniżenie poziomu serotoniny w korze czołowej myszy o około 77%. Oznacza to, że prawidłowy poziom serotoniny w mózgu jest konieczny do wywołania efektu przeciwdepresyjnego przez AMN082. Kolejną przesłanką przemawiającą za serotonergicznym profilem działania były wyniki uzyskane w teście FST u szczurów. Wykazałam zależny od dawki, silny efekt przeciwdepresyjny AMN082, przy czym zmiany zachowania zwierząt w tym teście dotyczyły dwóch z trzech badanych parametrów: czasu bezruchu oraz czasu pływania. Taki profil działania charakteryzujący LPD działające w oparciu o modulację układu serotonergicznego odróżnia je od LPD, które modulują układ noradrenergiczny i w teście FST wpływają na zmianę czasu bezruchu oraz czasu wspinania szczurów (Detke i wsp., 1995). Dodatkowo w teście TST u myszy wykazałam, że AMN082 podany w dawce podprogowej 0.3 mg/kg wywołuje efekt przeciwdepresyjny gdy jest podany łącznie z podprogową dawką citalopramu (5 mg/kg), który jest selektywnym inhibitorem wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI). Oznacza to wspólny mechanizm działania obu substancji. Podobnego efektu nie obserwowałam podczas podania podprogowej dawki AMN082 z podprogową dawką reboksetyny (2 mg/kg), będącej selektywnym inhibitorem wychwytu zwrotnego noradrenaliny, co sugeruje że mechanizm działania AMN082 w teście TST nie jest związany z modulacją układu noradrenergicznego. Wyniki dalszych eksperymentów wskazywały również na zaangażowanie receptora $5HT_{1A}$ w mechanizm przeciwdepresyjnego działania AMN082, gdyż antagonistą tego receptora, WAY100635, blokował jego przeciwdepresyjne działanie w teście TST. Podsumowując, badania zawarte w pracy nr (6) wskazują, że aktywność przeciwdepresyjna agonisty mGlu7, substancji AMN082, jest zależna od aktywności układu serotonergicznego. Ponadto, w pracy nr (6) po raz pierwszy wykazałam działanie przeciwdepresyjne AMN082 u szczurów, wykorzystując test FST. Wszystkie wcześniejsze prace dotyczące

przeciwdepresyjnej aktywności AMN082 zostały wykonane z wykorzystaniem eksperymentów przeprowadzonych na myszach.

Mimo, iż wyniki badań w omawianej pracy wskazują na istotną rolę układu serotonergicznego w mechanizmie działania AMN082 nie należy zapominać, iż wcześniejsze badania z wykorzystaniem myszy KO mGlu7, u których AMN082 nie wywoływał efektu behawioralnego w teście TST wskazywały jednoznacznie że obecność receptora mGlu7 jest kluczowa dla działania AMN082, a zatem pojawiający się po jego podaniu efekt przeciwdepresyjny nie może wynikać wyłącznie z działania wspomnianego wcześniej metabolitu AMN082, który jest selektywnym inhibitorem wychwytu zwrotnego monoamin. Wobec dostępności antagonisty receptora mGlu7, substancji MMPIP (6-(4-metoksyfenylo)-5-metylo-3-pirydino-4-ylisoksazolo[4,5-c]piridiny-4(5H)), postanowiłam wykorzystać go do eksperymentów behawioralnych celem zbadania jego wpływu na przeciwdepresyjne działanie AMN082 (7). Eksperyment ten wykonaliśmy z wykorzystaniem szczurów, które zostały poddane procedurze testu Porsolta (FST). Wykazaliśmy, że antagonistą receptora mGlu7, MMPIP podany szczurom 10 min przed podaniem AMN082, całkowicie zniósł działanie przeciwdepresyjne tej substancji. Dotyczyło to zarówno czasu bezruchu, jak i czasu pływania szczurów. Wynik ten jednoznacznie wskazuje, że aktywacja receptora mGlu7 jest niezbędnym elementem mechanizmu przeciwdepresyjnego działania AMN082. Co ciekawe, w omawianej pracy (7) wykazaliśmy również, że MMPIP nie wpływał na wywołany przez AMN082 spadek aktywności lokomotorycznej szczurów, co sugeruje że opisywany przez wielu autorów spadek ruchliwości zwierząt po podaniach AMN082 nie jest bezpośrednio związany z aktywacją receptora mGlu7. Wyniki te potwierdzają nasze wcześniejsze obserwacje, dyskutowane w pracy nr (5), dotyczące wpływu AMN082 na obniżenie aktywności lokomotorycznej zarówno myszy WT jak i myszy KO mGlu7.

Badania „szybkich” efektów przeciwdepresyjnych ligandów receptorów mGlu – analogie do działania ketaminy

W moich najnowszych badaniach podjęłam próbę znalezienia analogii w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania ligandów receptorów mGlu i ketaminy. Celem tych badań jest odpowiedź na pytanie, czy ligandy receptorów mGlu mogą stanowić skuteczną a zarazem bezpieczną alternatywę dla ketaminy w kontekście działań przeciwdepresyjnych. Jedną z wiodących hipotez, proponujących wyjaśnienie mechanizmu przeciwdepresyjnego działania ketaminy jest stymulacja procesów

synaptogenezy, w tym powstawanie nowych połączeń synaptycznych oraz zwiększenie gęstości kolców dendrytycznych w korze czołowej, w procesach zależnych od szlaku kinazy mTOR, odgrywającej kluczową rolę w inicjacji translacji białek niezbędnej w regulacji procesów synaptogenezy (Li i wsp., 2010). Nasilenie procesów synaptogenezy jest z kolei istotne w związku z koniecznością odtworzenia sieci neuronalnej, trwale uszkodzonej w wyniku przewlekłego stresu, będącego źródłem choroby depresyjnej (Duman et al., 2012). A zatem, regulacja kinazy mTOR wraz z wynikającymi z niej zmianami w procesie synaptogenezy, została zaproponowana jako główny mechanizm odpowiedzialny za przeciwdepresyjny efekt działania ketaminy. Stąd pojawiła się koncepcja badań nad ustaleniem roli tej kinazy w przeciwdepresyjnym działaniu ligandów receptorów mGlu. Pierwsze prace na ten temat dotyczyły antagonisty receptorów II grupy mGlu, substancji LY341495 i zostały opublikowane przez dwa niezależne zespoły badawcze. Wykazano, że LY341495 w godzinę po podaniu obwodowym nasila ekspresję ufosforylowanych form kinazy mTOR oraz innych czynników regulujących szlak aktywacji mTOR (4E-BP1, p70S6K, ERK), a także 24h po podaniu nasila ekspresję białek synaptycznych (Synapsyny 1, PSD-95, GluR1) (Dwyer i wsp., 2012). Wykazano również, że działanie przeciwdepresyjne LY341495 u myszy i szczurów jest blokowane przez antagonistę mTOR, rapamycynę (Dwyer i wsp., 2012, Koike i wsp., 2011). Istotne było również pojawianie się efektu przeciwdepresyjnego LY341495 24h po podaniu substancji, co wykazano w testach TST na myszach i FST na szczurach (Dwyer i wsp., 2012, Koike i wsp., 2011). Wyniki powyższych badań wskazują, że antagonistę II grupy receptorów mGlu w dużym stopniu naśladuje mechanizm związany z szybkim i trwałym (trwającym 24h) efektem działania ketaminy.

W swoich badaniach postanowiłam zbadać rolę aktywacji szlaku mTOR w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania innych ligandów receptorów mGlu, których aktywność przeciwdepresyjna w badaniach przedklinicznych jest najlepiej udokumentowana i które reprezentują dwie pozostałe grupy receptorów mGlu (I i III). Do badań wybrałam antagonistę receptorów mGlu5, MTEP oraz agonistę mGlu7, AMN082 (8). Wyniki wskazują jednoznacznie, iż przeciwdepresyjne działanie MTEP nie jest zależne od aktywacji szlaku mTOR. Antagonista mTOR, rapamycyna nie blokuje efektu przeciwdepresyjnego MTEP w teście FST, ponadto MTEP nie nasila aktywności szlaku mTOR (mierzonej poziomem ekspresji pmTOR, p70S6K i pERK) oraz nie wpływa na wzrost ekspresji białek synaptycznych (Synapsyny 1, PSD-95, GluR1) 23 h godziny po podaniu obwodowym. Dodatkowo MTEP nie wywołuje efektów przeciwdepresyjnych

23h po podaniu obwodowym, podczas gdy zastosowany jako substancja referencyjna związek LY341495 (antagonista II grupy mGlu) wywołuje taki efekt. Wydaje się zatem, że mechanizm przeciwdepresyjnego działania MTEP nie przypomina mechanizmu działania ketaminy. Odmienne wyniki uzyskaliśmy stosując w badaniach agonistę receptora mGlu7, AMN082. Wykazaliśmy że AMN082 już 60 min po podaniu obwodowym nasila ekspresję ufosforylowanych form mTOR i 70S6K, co świadczy o nasilonej aktywności szlaku kinazy mTOR. Efekt ten był blokowany przez antagonistę mTOR, rapamycynę, która blokowała również efekt behawioralny wywołany przez AMN082 w teście FST u szczurów. Ponadto obserwowaliśmy istotny wzrost poziomu białek synaptycznych Synapsyny 1 i GluR1, 23 h po obwodowym podaniu AMN082. Wszystkie omawiane efekty działania AMN082 są analogiczne do efektów wywoływanych przez ketaminę, ale nie obserwujemy pełnej analogii. Po pierwsze AMN082 nie wywołuje działania przeciwdepresyjnego 23h po podaniu obwodowym w teście FST u szczurów, co podważa coraz szerzej akceptowaną teorię mówiącą, iż przedłużony efekt działania przeciwdepresyjnego ketaminy i antagonistów II grupy receptorów mGlu jest związany z nasileniem procesów synaptogenezy, mierzonych m.in. poziomem białek synaptycznych. Nasze badania jasno pokazują, że mimo wzrostu poziomu tych białek 23 h po podaniu AMN082, żaden efekt przeciwdepresyjny się nie pojawia. Po drugie obserwowaliśmy, że działanie przeciwdepresyjne AMN082 nie było blokowane przez antagonistę receptorów AMPA, substancję NBQX, co sugeruje, że aktywacja receptorów AMPA nie jest konieczna do tego by pojawił się efekt przeciwdepresyjny AMN082, podczas gdy działanie zarówno ketaminy, jak i antagonisty receptorów II grupy mGlu, LY341495 jest całkowicie blokowane przez antagonistę AMPA. Podsumowując, nasze badania ujawniły unikalny mechanizm przeciwdepresyjnego działania agonisty receptora mGlu7, AMN082. Związek ten, analogicznie do ketaminy, stymuluje szlak aktywacji związany z kinazą mTOR oraz podnosi poziom białek synaptycznych, z drugiej strony nie wywołuje przedłużonego efektu przeciwdepresyjnego w modelu zwierzęcym oraz nie działa poprzez aktywację receptorów AMPA, czym przypomina klasyczne LPD.

Podsumowanie:

1. Spośród receptorów **I grupy mGlu** najbardziej obiecującym celem działania potencjalnych LPD jest receptor **mGlu5**. Antagoniści tego receptora (np. MPEP, MTEP) wykazują efekty przeciwdepresyjne w testach przesiewowych służących do

oceny przeciwdepresyjnego działania leków i w zwierzęcych modelach depresji. Przy ich użyciu wykazaliśmy, że mechanizm przeciwdepresyjnego działania antagonistów mGlu5 jest związany z aktywacją układu serotonergicznego. Ponadto antagoniści mGlu5 nie wykazują przedłużonego działania przeciwdepresyjnego w zwierzęcych modelach depresji i mechanizm ich działania nie jest zależny od aktywacji szlaku kinazy mTOR, co odróżnia je od wywołującego takie efekty antagonisty NMDA, ketaminy.

2. Silne efekty przeciwdepresyjne wywołują antagoniści receptorów **grupy II mGlu** (mGlu2 i mGlu3). Ich potencjalne działanie przeciwdepresyjne wykazaliśmy jako pierwsi w modelu depresji polegającym na usunięciu opuszek węchowych (OB) przy użyciu substancji MGS0039. Mechanizm działania antagonistów receptorów grupy II u zwierząt nie jest zależny od aktywacji układu serotonergicznego, natomiast w wielu aspektach przypomina działanie ketaminy – występuje zależność działania przeciwdepresyjnego od aktywacji szlaku kinazy mTOR oraz od aktywacji receptorów AMPA, a substancje te wywołują przedłużone działanie przeciwdepresyjne w zwierzęcych modelach depresji.
3. Aktywność przeciwdepresyjną wykazuje pozytywny allosteryczny modulator receptora **mGlu7**, AMN082, należącego do **III grupy** receptorów **mGlu**. Badania z użyciem zwierząt pozbawionych receptora mGlu7 (myszy KO mGlu7) oraz antagonisty receptora mGlu7 wskazują, że działanie przeciwdepresyjne AMN082 jest zależne od aktywacji receptora mGlu7. Z drugiej strony badania behawioralne wskazują, że w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania AMN082 istotną rolę odgrywa aktywacja układu serotonergicznego, co sugeruje istnienie interakcji pomiędzy układami glutaminianergicznym na poziomie receptora mGlu7 oraz układem serotonergicznym. Jednoznaczne wyjaśnienie roli receptora mGlu7 w wywoływaniu efektu przeciwdepresyjnego wymaga zastosowania selektywnej substancji aktywującej ten receptor, która jest na razie niedostępna.

Piśmiennictwo:

Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P: Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci*, 1996, 19:378-383.

Attucci S, Carla V, Mannaioni G, Moroni F: Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors enhances NMDA responses in mice cortical wedges. *Br J Pharmacol*, 2001, 132:799-806.

- Awad H, Hubert GW, Smith Y, Levey AI, Conn PJ: Activation of metabotropic glutamate receptor 5 has direct excitatory effects and potentiates NMDA receptor currents in neurons of the subthalamic nucleus. *J Neurosci*, 2000, 20:7871-7879.
- Belozertseva IV, Kos T, Popik P, Danysz W, Bessalov AY: Antidepressant-like effects of mGluR1 and mGluR5 antagonists in the rat forced swim and the mouse tail suspension tests. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2007, 17:172-179.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH: Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, 2000, 47:351-354.
- Blier P, Zigman D, Blier J: On the Safety and Benefits of Repeated Intravenous Injections of Ketamine For Depression. *Biol Psychiatry*, 2012, 72:e11-e12.
- Boothby LA, Doering PL: Acamprosate for the treatment of alcohol dependence. *Clin Ther*, 2005, 27:695-714.
- Bradbury MJ, Giracello DR, Chapman DF, Holtz G, Schaffhauser H, Rao SP, Varney MA, Anderson JJ: Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist-induced stimulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: interaction with serotonergic systems. *Neuropharmacology*, 2003, 44:562-572.
- Cartmell J, Schoepp DD: Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem*, 2000, 75:889-907.
- Chaki R, Yoshikawa S, Hirota T, Shimazaki M, Maeda, Kawashima N, Yoshimizu T, Yasuhara A, Sakagami K, Okuyama S, Nakanishi S, Nakazato A: MGS0039: a potent and selective group II metabotropic glutamate receptor antagonist with antidepressant-like activity. *Neuropharmacology*, 2004, 46:457-467.
- Conn PJ, Pin JP: Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37:205-237.
- Cosford ND, Tehrani L, Roppe J, Schweiger E, Smith ND, Anderson J, Bristow L, Brodtkin J, Jiang X, McDonald I, Rao S, Washburn M, Varney MA: 3-[(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine: a potent and highly selective metabotropic glutamate subtype 5 receptor antagonist with anxiolytic activity. *J Med Chem*, 2003, 46:204-206.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I: Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, 1995, 121:66-72.
- Diazgranados N, Ibrahim L, Brutsche NE, Newberg A, Kronstein P, Khalife S, Kammerer WA, Quezado Z, Luckenbaugh DA, Salvatore G, Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate Jr. CA: A randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression. *Arch Gen Psychiatry*, 2010, 67:793-802.
- Doherty AJ, Palmer MJ, Bortolotto ZA, Hargreaves A, Kingston AE, Ornstein PL, Schoepp DD, Lodge D, Collingridge GL: A novel, competitive mGlu(5) receptor antagonist (LY344545) blocks DHPG-induced potentiation of NMDA responses but not the induction of LTP in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol*, 2000, 131:239-244.
- Duman RS, Li N, Liu RJ, Duric V, Aghajanian G: Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology*, 2012, 62:35-41.
- Dwyer, JM, Lepack AE, Duman RS: mTOR activation is required for the antidepressant effects of mGluR_{2/3} blockade. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 15: 429-434 .

Fekadu A, Wooderson SC, Markopoulo K, Donaldson C, Papadopoulos A, Cleare AJ: What happens to patients with treatment-resistant depression? A systematic review of medium to long term outcome studies *J Affect Disord*, 2009, 116:4–11.

Franklin M, Bermudez I, Murck H, Singewald N, Gaburro S: Sub-chronic dietary tryptophan depletion—an animal model of depression with improved face and good construct validity. *J Psychiatr Res*, 2012, 46:239-247.

González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, López-Giménez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, Sealfon SC: Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, 2008, 452: 93-97.

Harris BR, Prendergast MA, Gibson DA, Rogers DT, Blanchard JA, Holley RC, Fu MC, Hart SR, Pedigo NW, Littleton JM. Acamprosate inhibits the binding and neurotoxic effects of trans-ACPD, suggesting a novel site of action at metabotropic glutamate receptors. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002, 26:1779-93.

Heidbreder CA, Bianchi M, Lacroix LP, Faedo S, Perdona E, Remelli R, Cavanni P, Crespi F: Evidence that the metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP may act as an inhibitor of the norepinephrine transporter in vitro and in vivo. *Synapse*, 2003, 50:269-276.

Hughes ZA, Neal SJ, Smith DL, Sukoff Rizzo SJ, Pulicicchio CM, Lotarski S, Lu S: Negative allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5 results in broad spectrum activity relevant to treatment resistant depression. *Neuropharmacology*, 2013, 66:202-214.

Ibrahim L, Diazgranados N, Luckenbaugh DA, Machado-Vieira R, Baumann J, Mallinger AG, Zarate CA: Rapid decrease in depressive symptoms with an N-methyl-d-aspartate antagonist in ECT-resistant major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35:1155-1159.

Iijima M, Fukumoto K, Chaki S: Acute and sustained effects of a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist in the novelty-suppressed feeding test. *Behav Brain Res*, 2012, 235:287-292.

Karasawa J, Shimazaki T, Kawashima N, Chaki S: AMPA receptor stimulation mediates the antidepressant-like effect of a group II metabotropic glutamate receptor antagonist. *Brain Res*, 2005, 1042:92–98.

Kawashima N, Karasawa J, Shimazaki T, Chaki S, Okuyama S, Yasuhara A, Nakazato A: Neuropharmacological profiles of antagonists of group II metabotropic glutamate receptors. *Neurosci Lett*, 2005, 378:131–134.

Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther*, 1997, 74:299-316.

Kinoshita A, Shigemoto R, Ohishi H, van der Putten H and Mizuno N: Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 1998, 393:332-352.

Koike H, Iijima M, Chaki S: Involvement of the mammalian target of rapamycin signaling in the antidepressant-like effect of group II metabotropic glutamate receptor antagonists. *Neuropharmacology*, 2011, 61:1419-1423.

Krystal JH, Sanacora G, Duman RS: Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry*, 2013, 73:1133-1141.

Lavreysen H, Dautzenberg FM: Therapeutic potential of group III metabotropic glutamate receptors. *Curr Med Chem*, 2008, 15:671-684.

Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS: mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 2010, 329:959-964.

Li X, Need AB, Baez M, Witkin JM: Metabotropic glutamate 5 receptor antagonism is associated with antidepressant-like effects in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319:254-259.

Mathiesen JM, Svendsen N, Brauner-Osborne H, Thomsen C, Ramirez MT: Positive allosteric modulation of the human metabotropic glutamate receptor 4 (hmGluR4) by SIB-1893 and MPEP. *Br J Pharmacol*, 2003,138:1026-1030.

Mitsukawa K, Yamamoto R, Ofner S, Nozulak J, Pescott O, Lukic S, Stoehr N, Mombereau C, Kuhn R, McAllister KH, van der Putten H, Cryan JF, Flor PJ: A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102:18712-18717.

Molinaro G, Traficante A, Riozzi B, Di Menna L, Curto M, Pallottino S, Nicoletti F, Bruno V, Battaglia G: Activation of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors negatively regulates the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis mediated by 5-hydroxytryptamine_{2A} serotonin receptors in the frontal cortex of living mice. *Mol Pharmacol*, 2009, 76:379-387.

Nakanishi S: Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 1992, 258:597-603.

Nowak G, Legutko B, Skolnick P, Popik P: Adaptation of cortical NMDA receptors by chronic treatment with specific serotonin reuptake inhibitors. *Eur J Pharmacol*, 1998, 342:367-370.

O'Leary OF, Bechtholt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I: Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology*, 2007, 192:357-371.

O'Leary DM, Movsesyan V, Vicini S, Faden AI. Selective mGluR5 antagonists MPEP and SIB-1893 decrease NMDA or glutamate-mediated neuronal toxicity through actions that reflect NMDA receptor antagonism. *Br J Pharmacol*, 2000, 131:1429-1437.

Pałucha A, Brański P, Tokarski K, Bijak M, Pilc A: Influence of imipramine treatment on the group I of glutamate metabotropic receptors in CA1 region of hippocampus. *Pol J Pharmacol*, 1997, 49:495-497.

Pałucha A, Pilc A: Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol Ther*, 2007,115:116-147.

Pałucha A, Tatarczyńska E, Brański P, Szewczyk B, Wierońska JM, Chojnacka-Wójcik E, Nowak G, Pilc A: Group III mGlu receptor agonists produce anxiolytic-and antidepressant-like effects after central administration in rats. *Neuropharmacology*, 2004, 46:151-159.

Paul IA, Layer RT, Skolnick P, Nowak G: Adaptation of the NMDA receptor in rat cortex following chronic electroconvulsive shock or imipramine. *Eur J Pharmacol*, 1993, 247:305-311.

Pilc A, Brański P, Pałucha A, Tokarski K, Bijak M: Antidepressant treatment influences group I of glutamate metabotropic receptors in slices from hippocampal CA1 region. *Eur J Pharmacol*, 1998, 349:83-87.

Pilc A, Kłodzińska A, Brański P, Nowak G, Pałucha A, Szewczyk B, Tatarczyńska E, Chojnacka-Wójcik E, Wierońska J.M: Multiple MPEP administrations evoke anxiolytic- and antidepressant-like effects in rats. *Neuropharmacology*, 2002, 43:181-187.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M: Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, 1978, 47:379-391.

Sanacora G, Smith MA, Pathak S, Su H-, Boeijinga PH, McCarthy DJ, Quirk MC: Lanicemine: a low-trapping NMDA channel blocker produces sustained antidepressant efficacy with minimal psychotomimetic adverse effects. *Mol Psychiatry*, 2013, DOI: 10.1038/mp.2013.130.

Skolnick P: Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol*, 1999, 375:31-40.

Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R: Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry*, 1996, 29:23-6.

Stachowicz K, Gołombiowska K, Sowa M, Nowak G, Chojnacka-Wójcik E, Pilc A: Anxiolytic-like action of MTEP expressed in the conflict drinking Vogel test in rats is serotonin dependent. *Neuropharmacology*, 2007, 53:741-748.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P: The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 1985, 85:367-370.

Sukoff Rizzo SJ, Leonard SK, Gilbert A, Dollings P, Smith DL, Zhang MY, Di L, Platt BJ, Neal S, Dwyer JM, Bender CN, Zhang J, Lock T, Kowal D, Kramer A, Randall A, Huselton C, Vishwanathan K, Tse SY, Butera J, Ring RH, Rosenzweig-Lipson S, Hughes ZA, Dunlop J. The metabotropic glutamate receptor 7 allosteric modulator AMN082: a monoaminergic agent in disguise? *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 338:345-352.

Szewczyk B, Pałucha-Poniewiera A, Poleszak E, Pilc A, Nowak G: Investigational NMDA receptor modulators for depression. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21:91-102.

Tatańczyńska E, Kłodzińska A, Chojnacka-Wójcik E, Pałucha A, Gasparini F, Kuhn R, Pilc A: Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, 2001, 132:1423-1430.

Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen H: The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, 2011, 21:655-679.

Yoshimizu T, Chaki S: Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315:493-496.

Yoshimizu T, Shimazaki T, Ito A, Chaki S: An mGluR2/3 antagonist, MGS0039, exerts antidepressant and anxiolytic effects in behavioral models in rats. *Psychopharmacology*, 2006, 186:587-593.

Zarate Jr. CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK: A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*, 2006, 63:856-864.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

3.1. Dane parametryczne i ilość publikacji

Sumaryczny impact factor (według listy Journal Citation Reports (JCR)):	151,9
Liczba cytowań publikacji (według bazy Web of Science (WoS)):	1721
Indeks Hirscha (według bazy Web of Science (WoS)):	23

	<i>Przed doktoratem</i>		<i>Po doktoracie</i>	
	<i>w jez. polskim</i>	<i>w jęz. angielskim</i>	<i>w jez. polskim</i>	<i>w jęz. angielskim</i>
Oryginalne	-	21	-	24
Poglądowe	2	1	-	8
Rozdziały	3	-	5	1
Komunikaty (zjazdy międzynarodowe)	-	41	-	50
Komunikaty (zjazdy krajowe)	2	5	-	4

3.2. *Inne realizowane tematy badawcze*

A/ Wpływ ligandów receptorów mGlu na behawioralne efekty odstawienia od opiatów

Badania na ten temat rozpoczęłam w roku 1998. Znana była już wówczas zależność pomiędzy aktywnością układu glutaminianergicznego a nasileniem objawów w zespole odstawienia od opiatów. Celem pierwszych podjętych przez nas eksperymentów było zbadanie wpływu pierwszego biodostępnego po podaniach obwodowych agonisty receptorów grupy II mGlu, substancji LY 354740, na behawioralne efekty odstawienia od morfiny. Wykazaliśmy zależny od dawki i istotny statystycznie wpływ LY 354740 na te efekty w modelu odstawienia od opiatów u myszy, a praca prezentująca te wyniki (Kłodzińska i wsp., *Neuropharmacology*, 1999) rozpoczęła całą serię badań dotyczących przeciwwzależnieniowych efektów ligandów mGlu i do dnia dzisiejszego została zacytowana ponad 100 razy. Kolejne badania w tym temacie dotyczyły ligandów kolejnych receptorów mGlu. Wykazaliśmy, że na osłabienie efektów odstawienia od morfiny w zwierzęcym modelu u myszy istotny wpływ mają m.in.: antagonistą receptora mGlu5, MTEP (Pałucha i wsp., *Pol J Pharmacol*, 2004; ilość cytowań: 20) oraz agonista receptorów III grupy mGlu, ACPT-I (Pałucha-Poniewiera i wsp., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009; ilość cytowań: 4).

B/ Potencjalne przeciwpsychotyczne efekty ligandów receptorów mGlu

Badania na ten temat rozpoczęłam w roku 2007. Celem zaplanowanych przez nas

eksperymentów było zbadanie potencjalnych przeciwpsychotycznych efektów agonisty receptorów III grupy mGlu, substancji ACPT-I. Wcześniejsze badania innych autorów wskazywały na potencjał przeciwpsychotyczny ligandów receptorów grupy II mGlu, które odgrywają rolę w hamowaniu uwalniania glutaminianu, stąd hipoteza o podobnym działaniu terapeutycznym ligandów receptorów grupy III pełniących rolę głównych autoreceptorów glutaminianergicznych. Potencjalne przeciwpsychotyczne własności ACPT-I wykazaliśmy w szczurzym modelu hyperaktywności wywołanej amfetaminą lub MK-801. Ponadto wykazaliśmy potencjalne działanie przeciwhalucynogenne w modelu skrętów głowy (ang. *head-twitch*) wywołanych agonistą receptora 5HT_{2A}, substancją DOI. Potwierdzeniem badań behawioralnych były wyniki eksperymentów elektrofizjologicznych wskazujących, iż ACPT-I obniża wywołany przez DOI wzrost częstotliwości i amplitudy EPSP. Praca prezentująca wyniki tych badań (Pałucha-Poniewiera i wsp.: "Peripheral administration of group III mGlu receptor agonist ACPT-I exerts potential antipsychotic effects in rodents") została opublikowana w *Neuropharmacology* w roku 2008 i do dnia dzisiejszego została zacytowana 20 razy.

C/ Potencjalne działanie przeciwdepresyjne ligandów III grupy receptorów mGlu

Przeciwdepresyjne działanie ligandów mGlu to główny nurt moich badań od momentu rozpoczęcia eksperymentów do doktoratu. Zaowocował on autorstwem lub współautorstwem szeregu publikacji naukowych które nie zostały zawarte w Pkt. 2.1. jako osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. Dotyczyły one głównie ligandów receptorów III grupy mGlu. Pierwsza praca na ten temat dotyczyła przeciwdepresyjnych własności podawanych do komór bocznych mózgu szczura agonistów tych receptorów: m.in. ACPT-I i RS-PPG. Związki te wykazywały potencjalne działanie przeciwdepresyjne w teście FST (Pałucha i wsp., *Neuropharmacology*, 2004; ilość cytowań 95), a kolejne badania wskazywały na nasilenie działania agonisty receptorów III grupy mGlu, ACPT-I przez substancję będącą allosterycznym modulatorem pozytywnym receptora mGlu4, substancję o symbolu PHCCC (Kłak i wsp., *Amino Acids*, 2007; ilość cytowań: 33). Późniejsze badania behawioralne w których uczestniczyłam nie potwierdziły przeciwdepresyjnego działania ACPT-I po podaniach obwodowych w testach FST i TST u myszy (Stachowicz i wsp., *Neuropharmacology*, 2009; ilość cytowań: 18). Kilkakrotnie

wykazywałam również brak aktywności przeciwdepresyjnej pozytywnych allosterycznych modulatorów receptorów mGlu4, a wyniki moich badań znalazły się w pracach dotyczących szerszego spektrum terapeutycznego tych substancji (m.in.: Wierońska i wsp., *Neuropharmacology*, 2010; ilość cytowań 22; Sławińska i wsp., *Neuropharmacology*, 2013; ilość cytowań 7).

3.3. *Prace przeglądowe*

Istotną częścią mojej pracy naukowej było i jest autorstwo lub współautorstwo wielu prac przeglądowych, dotyczących zagadnień które są przedmiotem moich badań. Prace te zawierały nie tylko systematyczny przegląd literatury światowej, ale również wyniki moich badań i autorskie hipotezy dotyczące mechanizmów przeciwdepresyjnego działania ligandów receptorów mGlu. Prace te są systematycznie cytowane przez innych autorów. Oto kilka przykładów:

1. **Pałucha A**, Pilc A: Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic or antidepressant drugs. *Pharmacol Therap*, 2007, 115:116-147.
IF = 7,968; liczba cytowań: 128
2. **Pałucha A**, Pilc A: The involvement of glutamate in the pathophysiology of depression. *Drugs News & Perspectives*, 2005, 18:262-268.
bez IF; liczba cytowań: 54
3. **Pałucha A**, Pilc A: On the role of metabotropic glutamate receptors in the mechanism of action of antidepressants. *Pol J Pharmacol*, 2002, 54:581-586.
IF = 0,684; liczba cytowań: 39
4. Chaki S, Ago Y, **Pałucha-Poniewiera A**, Matrisciano F, Pilc A. mGlu2/3 and mGlu5 receptors: potential targets for novel antidepressants. *Neuropharmacology*, 2013,66:40-52.
IF = 4,819; liczba cytowań: 17
5. Szewczyk B, **Pałucha-Poniewiera A**, Poleszak E, Pilc A, Nowak G. Investigational NMDA receptor modulators for depression. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21:91-102.
IF = 4,744; liczba cytowań:16
6. **Pałucha A**: Are compounds acting at metabotropic glutamate receptors the answer to treating depression? *Expert Opin Investig Drugs*, 2006, 15:1545-1553.
IF = 2,705; liczba cytowań: 14

3.4. *Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową*

- 3.4.1. Nagroda Stowarzyszenia Zbiorowego Zarządzania Prawami Autorskimi Twórców Dzieł Naukowych i Technicznych KOPIPOL, za pracę "Possible involvement of mGluR1 together

- with group II and III mGluRs in ibotenate-stimulated cAMP formation in the rat brain cortical slices.", autorstwa: Pałucha A., Brański P., Krocza B., Pilc A. (Pol. J. Pharmacol., 2000, 52, 353-358), przyznana w roku 2000.
- 3.4.2. Stypendium krajowe Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (program START- roczne stypendia dla wybitnych młodych uczonych na początku kariery naukowej posiadających udokumentowane osiągnięcia w swojej dziedzinie badań), przyznane za rok 2002.
- 3.4.3. Nagroda Fundacji im. J.J. Supniewskich za całokształt działalności naukowej w roku 2003 w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie
- 3.4.4. Stypendium krajowe Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (program START- roczne stypendia dla wybitnych młodych uczonych na początku kariery naukowej posiadających udokumentowane osiągnięcia w swojej dziedzinie badań), przyznane za rok 2003.
- 3.4.5. Nagrody Dyrektora Instytutu Farmakologii PAN za wyróżniające się prace oryginalne przyznane w roku: 2002 (Tatarczyńska i wsp., 2001, *Brit J Pharmacol*), 2003 (Pilc i wsp., 2002, *Neuropharmacology*), 2005 (Pałucha i wsp., 2004, *Neuropharmacology*); 2006 (Wierońska i wsp., 2005, *Neuropsychopharmacology*), 2008 (Pałucha i Pilc, 2007, *Pharmacol & Therap*), 2009 (Pałucha-Poniewiera i wsp., 2008, *Neuropharmacology*).
- 3.4.6. Nagroda w programie „QUANTITAS” i „QUALITAS” przyznawana z funduszu KNOW za prace naukowe opublikowane w roku 2013 przez autorów zatrudnionych w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. Nagrodzone prace: Pałucha-Poniewiera i Pilc, *Behav Brain Res*, 2013; Pałucha-Poniewiera i wsp., *Pharmacol Rep*, 2013; Wierońska i wsp., *Neuropharmacology*, 2013.
- 3.4.7. Stypendia konferencyjne i nagrody za doniesienia naukowe:
A/ Nagroda Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego w konkursie abstraktów na 6th Joint Meeting of the Italian, Hungarian and Polish Pharmacological Societies, 14-16.05.1999, Piza, Włochy.

B/ Stypendium konferencyjne dla młodych pracowników naukowych uzyskane w III edycji konkursu organizowanego przez Towarzystwo Naukowe Warszawskie i FNP, w związku z udziałem w 15th ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Congress, 5-9.10.2002, Barcelona, Hiszpania.

C/ Nagroda "ECNP Travel Award" przyznana przez European College of Neuropsychopharmacology, za doniesienie pt.: Potential anti-addictive effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist", autorstwa: Pałucha A., Brański P., Szewczyk B., Wierońska J., Tokarski K., Pilc A., prezentowane podczas 15th ECNP Congress, 5-9.10.2002, Barcelona, Hiszpania.

D/ Stypendium konferencyjne przyznane przez International Brain Research Organization w związku z udziałem w 6th IBRO World Congress of Neuroscience, 10-15.07.2003, Praga, Czechy.

E/ Nagroda za doniesienie pt.: "Potential antidepressant-like effect of 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine (MTEP), a potent and highly selective mGluR5 antagonist" prezentowane podczas ECNP Workshop on Neuropsychopharmacology for Young Scientists in Europe. 3-6. 03.2005 Nicea, Francja.

F/ Stypendium konferencyjne dla młodych pracowników naukowych uzyskane w konkursie organizowanym przez Towarzystwo Naukowe Warszawskie i FNP, w związku z udziałem w The 15th World Congress of Pharmacology (IUPHAR 2006). 2-7 July 2006 Pekin, Chiny.

3.5. *Udział w projektach badawczych oraz programach europejskich i krajowych*

A/ Kierownik projektu: „Wpływ pobudzenia metabotropowych receptorów glutaminianergicznych (mGluR) na akumulację cAMP”. Nr projektu: 4.P05A.072.17. Organ przyznający fundusze: Komitet Badań Naukowych. Termin projektu: 1999 – 2000.

B/ Wykonawca w projekcie promotorskim: „Rola receptorów metabotropowych dla pobudzających aminokwasów w mechanizmie działania leków

przeciwdepresyjnych”. Nr projektu: 4 P05A 027 19. Organ przyznający fundusze: Komitet Badań Naukowych. Termin projektu: 2000 – 2002.

C/ Wykonawca w projekcie: „Wpływ antydepresantów na receptory metabotropowe grupy I dla pobudzających aminokwasów”. Nr projektu: 4 P05A 091 17. Organ przyznający fundusze: Komitet Badań Naukowych. Termin projektu: 2000 – 2002.

D/ Wykonawca w projekcie: „Potencjalne przeciwdepresyjne własności agonistów III grupy receptorów metabotropowych dla glutaminianu (mGluR)”. Nr projektu: 3P05A 077 25. Organ przyznający fundusze: Komitet Badań Naukowych. Termin projektu: 2004 – 2006.

E/ Wykonawca w projekcie: „Badanie przeciwdepresyjnych własności ligandów trzeciej rodziny receptorów związanych z białkami G (GPCR) oraz ich roli w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych”. Nr projektu: 34/4/2006. Organ przyznający fundusze: Fundacja na Rzecz wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny „Polfarma”. Termin projektu: 2006 – 2009.

F/ Wykonawca w projekcie: „Modulacja allosteryczna – nowa strategia w farmakoterapii. Identyfikacja własności psychotropowych ligandów receptorów glutaminianergicznym III grupy”. Nr projektu: UDA-POIG.01.03.01-12-100/08-00. Organ przyznający fundusze: Fundusze Europejskie - Program Innowacyjna Gospodarka. Termin projektu: 2008 – 2012.

G/ Wykonawca w projekcie: „Agoniści receptorów mGlu4, mGlu7 i mGlu8 jako potencjalne leki przeciwdepresyjne i przeciwłękowe - interakcje z układem serotoninowym”. Nr projektu N N405 055737. Organ przyznający fundusze: MNiSW. Termin projektu: 2009 – 2012.

H/ Wykonawca w projekcie „Depresja – Mechanizmy – Terapia” (De-Me-Ter). Nr projektu: POIG 01.01.02-12-004/09-00. Organ przyznający fundusze: Fundusze Europejskie - Programu Innowacyjna Gospodarka. Termin projektu: 2010 – 2014.

3.6. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych

A/ Wygłoszenie wykładu p.t. „Metabotropowe receptory glutaminianergiczne w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych”, podczas sympozjum „Nowe kierunki w badaniach leków przeciwdepresyjnych”, organizowanego przez IF PAN w Krakowie. Sympozjum odbyło się w Katedrze Neurologii CM UJ, Kraków, 23.11.2001.

B/ Wygłoszenie nagrodzonego przez ECNP doniesienia p.t.: Potential antidepressant-like effect of 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine (MTEP), a potent and highly selective mGluR5 antagonist”, autorstwa Pałucha A, Brański P, Szewczyk B, Wierońska JM, Pilc A , podczas 18th ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Congress, 22-26. 10. 2005, Amsterdam, Holandia.

C/ Wygłoszenie wykładu pt.: „Układ glutaminianergiczny – rola magnezu”, podczas Sympozjum „Magnez w patofizjologii i terapii zaburzeń depresyjnych i lękowych”, organizowanego przez Instytut Farmakologii, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Polskie Towarzystwo Farmakologiczne i Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum UJ. Kraków, 12.04.2005.

D/ Wygłoszenie wykładu plenarnego pt.: „Rola układu glutaminianergicznego w patofizjologii depresji”, podczas XV Międzynarodowego Sympozjum Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN nt.: Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej. Kraków, 1-2 06.2006.

E/ Wygłoszenie wykładu p.t.: „Rola układu glutaminianergicznego w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych” , podczas XXVI Zimowej Szkoły Instytutu Farmakologii PAN pt. „Pobudzające aminokwasy III”. Kraków 17-20 lutego 2009.

F/ Wygłoszenie wykładu pt.: „Glutaminianergiczna teoria depresji i działania leków przeciwdepresyjnych”, podczas XXXI Zimowej Szkoły Instytutu Farmakologii PAN pt.: „Depresja i leki przeciwdepresyjne”. Kraków 14-17.01.2014.

3.7. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

A/ Nazwa czasopisma: Behavioral Brain Research. Wydawnictwo: Elsevier

Liczba recenzowanych manuskryptów: 1

Okres recenzji: 5 – 13.05.2014

B/ Nazwa czasopisma: Neuropharmacology. Wydawnictwo: Elsevier

Liczba recenzowanych manuskryptów: 1

Okres recenzji: 1 – 15. 06 2011

C/ Nazwa czasopisma: Polish Journal of Pharmacology. Wydawca: Instytut Farmakologii PAN

Liczba recenzowanych manuskryptów: 6

Okres recenzji: 4 – 13.05.2002; 12 – 27.02.2003; 14 – 27.02.2004; 7 – 19.03.2004; 10 – 22.06.2004; 11 – 24. 11 2004

D/ Nazwa czasopisma: Pharmacological Reports. Wydawnictwo: Elsevier

Liczba recenzowanych manuskryptów: 2

Okres recenzji: 12 – 25..09.2012; 27.02 – 27.03.2014

E/ Nazwa czasopisma: Research in Neurology: An International Journal.

Wydawnictwo: IBIMA Publishing, USA

Liczba recenzowanych manuskryptów: 1

Okres recenzji: 29.10 – 12.11.2013

3.8. Aktywny udział w międzynarodowych konferencjach naukowych

1. 6th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology, June 3-5, 1997, Kraków, Polska.
2. 3rd International Congress of the Polish Neuroscience Society, September 7-10, 1997, Łódź, Polska.
3. 6th Joint Meeting of the Italian, Hungarian and Polish Pharmacological Societies, May 14-16, 1998, Piza, Włochy.
4. 7th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS, 1998, Kraków, Polska

5. XVII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 10-13.09, 1998, Kraków, Polska.
6. 8th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS, 1999, Kraków, Polska.
7. 4th International Congress of the Polish Neuroscience Society, September 2-5, 1999, Gdańsk, Polska.
8. 5th ECNP Regional Meeting, April 15-17, 2000, St. Petersburg, Rosja.
9. XIV International Congress of the Polish Pharmacological Society, September 10-13, 2001, Kraków, Polska.
10. 14th ECNP Congress, October 13-17, 2001, Sztambuł, Turcja.
11. 3rd Forum of European Neuroscience. 13-17. 07. 2002, Paryż, Francja.
12. 15th ECNP Congress, 5-9.10.2002, Barcelona, Hiszpania.
13. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, 10-15.07.2003, Praga, Czechy.
14. 4th Forum of European Neuroscience, 10-14.07.2004, Lizbona, Portugalia.
15. XV International Congress of the Polish Pharmacological Society, 12-14.09.2004, Poznań, Polska.
16. ECNP Workshop on Neuropsychopharmacology for Young Scientists in Europe, 3-6. 03.2005, Nicea, Francja.
17. 18th ECNP Congress, 22-26. 10. 2005, Amsterdam, Holandia.
18. The 15th World Congress of Pharmacology (IUPHAR 2006). 2-7 July 2006, Pekin, Chiny.
19. 7th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, 2-7. 10. 2011, Taormina, Sycylia, Włochy.
20. 8th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, 27.09-3.10.2014, Taormina, Sycylia, Włochy.

A. Pałucha - Poniewiera