

mgr Edyta Możdżeń

Zakład Neurochemii IF PAN, ISD MOL-MED

TEMAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

*Wielokierunkowa analiza przeciwdepresyjnych efektów endogennej aminy 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny oceniana w testach behawioralnych oraz w badaniach molekularnych i krystalograficznych w porównaniu z referencyjnym lekiem, imipraminą*

PROMOTORZY:

prof. dr hab. Lucyna Antkiewicz-Michaluk; prof. dr hab. Krzysztof Lewiński

RECENZENCI:

prof. dr hab. Elżbieta Nowakowska; prof. dr hab. Stanisław J. Czuczwar

**Streszczenie**

Depresja endogenna należy do chorób afektywnych, w których podstawowym zaburzeniem jest obniżenie nastroju, a także często napędu oraz upośledzenie mechanizmu snu i różnych rytmów biologicznych. Choroby afektywne mogą przebiegać jednofazowo (depresja) lub dwufazowo (depresja/mania). Znane są też depresje i reakcje depresyjne występujące w związku z określonymi bodźcami zewnętrznymi i sytuacjami stresowymi. Mechanizm powstawania depresji nie został wciąż w pełni poznany. W wielu przypadkach występują objawy świadczące o osłabieniu czynności neuronów dopaminergicznych, serotonergicznych i noradrenergicznych. Bardzo charakterystyczne są także zaburzenia hormonalne, szczególnie nasilone wydzielanie kortyzolu. Większość stosowanych obecnie leków przeciwdepresyjnych wpływa na transmisję monoaminergiczną poprzez hamowanie wychwytu zwrotnego monoamin w mózgu. Dziś coraz częściej zwraca się uwagę na fakt, iż depresja to zespół zaburzeń psychicznych o znacznym nasileniu w skali światowej. W różnej formie dotyka ona średnio 20-25% ludności, niezależnie od płci i wieku. Ze względu na niską skuteczność dostępnych leków oraz istnienie tzw. depresji lekoopornej istnieje konieczność poszukiwania nowych strategii leczniczych w depresji. Wciąż trwają więc poszukiwania

idealnego leku przeciwdepresyjnego; leku, który odznaczałby się wysoką skutecznością działania, nie powodowałby poważnych powikłań ubocznych i charakteryzowałby się niskim ryzykiem przejścia w fazę maniakalną.

1,2,3,4-Tetrahydroizochinolina (TIQ) to amina występująca naturalnie w wielu roślinach, produktach spożywczych oraz mózgu ssaków. W niskich stężeniach  $\mu\text{M}$  jest odwracalnym inhibitorem MAO-A i MAO-B. Mimo podobieństwa strukturalnego do MPTP, TIQ nie wykazuje właściwości toksycznych. Nie posiada bowiem w swojej strukturze grupy metylowej przy atomie azotu, która nadaje właściwości toksyczne innym związkom z rodziny TIQs. Dotychczasowe badania dowodzą, iż TIQ posiada właściwości neuroprotektoryjne w różnych modelach *in vitro* oraz *in vivo* – jest zmiataczem wolnych rodników hydroksylowych, znacząco podnosi poziom zredukowanego glutationu w strukturach mózgowych zwiększając tym samym zdolności antyoksydacyjne neuronów i hamuje ekscytotoksyczność wywołaną przez glutaminian. Biorąc pod uwagę łatwość przenikania TIQ przez barierę krew-mózg oraz właściwości neuroprotektoryjne uzasadnione wydaje się sprawdzenie potencjalnego działania tej endogennej aminy w depresji.

Celem badań było sprawdzenie potencjalnych właściwości przeciwdepresyjnych TIQ w zwierzęcych modelach depresji. Przeciwdepresyjne działanie tej aminy oceniono w szeroko stosowanym i odznaczającym się wysoką przewidywalnością zachowań depresyjnych gryzoni teście wymuszonego pływania (FST) i teście zawieszenia za ogon u myszy (TST). W celu wykluczenia ewentualnego psychostymulującego działania TIQ przeprowadzono test spontanicznej aktywności lokomotorycznej u gryzoni. W badaniach zastosowano także model chronicznego łagodnego stresu (CMS) podkreślający istotną rolę stresu w rozwoju anhedonii, kluczowego objawu współczesnej depresji. Jako lek referencyjny w przeprowadzonych badaniach zastosowano imipraminę. Dodatkowo, sprawdzono wpływ citalopramu na efekty TIQ oraz działanie TIQ w rezerpinowym modelu depresji u szczurów. Poszukiwania nowych i skuteczniejszych leków przeciwdepresyjnych koncentrują się w dużej mierze na dobrze udokumentowanych teoriach monoaminergicznym w etiopatogenezie depresji. Dotyczą one synaps neuronów dopaminergicznym, serotonergicznym oraz noradrenergicznym. Dlatego też badania behawioralne uzupełniono poprzez analizę biochemiczną *ex vivo* obejmującą oznaczenie stężeń monoamin: dopaminy (DA), serotoniny (5-HT), noradrenaliny (NA) oraz ich metabolitów w różnych strukturach mózgu szczura. Z wykorzystaniem techniki mikrodializy *in vivo* sprawdzono także wpływ TIQ na uwalnianie neuroprzekaźników: DA, NA, 5-HT w prążkowie swobodnie poruszającego się szczura. Podjęto także próbę

uzupełnienia analizy behawioralnej i biochemicznej badaniami z zakresu krystalografii (krystalizacja metodą dyfuzji przez fazę gazową z wykorzystaniem techniki wiszącej kropli) i kinetyki enzymatycznej reakcji (pomiaru kalorymetrycznego z wykorzystaniem techniki izotermalnej kalorymetrii miareczkowej, ITC) w celu uzyskania informacji pomocnych przy modyfikacji cząsteczki TIQ lub projektowaniu nowej, o potencjalnie silniejszych właściwościach przeciwdepresyjnych.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, iż testowana w szerokim zakresie dawek amina, TIQ podobnie jak klasyczny lek przeciwdepresyjny, imipramina wykazuje aktywność przeciwdepresyjną w zastosowanych zwierzęcych modelach depresji. Skraca czas bezruchu zwierząt w teście FST i TST, a podana łącznie z lekiem referencyjnym czy citalopramem nasila ich przeciwdepresyjne efekty. Także w modelu rezerpinowym, TIQ skraca czas bezruchu szczurów w teście FST i nie tylko po chronicznym (14x), ale już po jednorazowym podaniu całkowicie antagonizuje prodepresyjne działanie rezerpiny. W modelu CMS, TIQ wykazuje działanie przeciwdepresyjne o sile porównywaną do imipraminy – całkowicie odwraca zjawisko anhedonii u szczurów wywołanej przewlekłym narażeniem tych zwierząt na łagodne czynniki stresowe. Dodatkowo, brak pobudzenia motorycznego w teście spontanicznej aktywności lokomotorycznej po podaniu TIQ wyklucza ewentualne właściwości psychostymulujące tej substancji. Wyniki analizy biochemicznej potwierdzają obserwacje z testów behawioralnych i wskazują na szerokie spektrum działania TIQ w OUN obejmujące układ dopaminergiczny, noradrenergiczny i serotonergiczny. W przeprowadzonych badaniach *ex vivo* wykazano, iż TIQ blokuje szlak oksydacji DA zależny od aktywności MAO i przekierowuje katabolizm DA na drogę bezpieczniejszej i zależnej od COMT *O*-metylacji, co wiąże się z obniżaniem poziomu DOPAC i jednoczesnym zwiększaniem stężenia 3-MT w wybranych strukturach mózgu. Dodatkowo, TIQ nasila hamowanie wychwytu zwrotnego DA wyrażone jako indeks  $[3\text{-MT}]/[\text{DOPAC}]$ . Obserwowano także wzrost stężenia zewnątrzneuronalnego metabolitu NA, NM po podaniu TIQ, co wiąże się z nasileniem uwalniania NA i aktywacją układu noradrenergicznego pod wpływem badanej aminy. Wykazano również wzrosty stężenia 5-HT i spadki poziomu jej metabolitu, 5-HIAA oraz obniżenie szybkości metabolizmu 5-HT w analizowanych strukturach mózgu gryzoni pod wpływem TIQ. Analiza biochemiczna wykonana metodą mikrodializy *in vivo* w prążkowie swobodnie poruszającego się szczura potwierdziła wyniki badań *ex vivo* i wykazała, iż TIQ podnosi zewnątrzkomórkowe stężenia amin biogennych: DA, NA i 5-HT.

Zastosowane w badaniach warunki krystalizacji nie pozwoliły na uzyskanie kryształów MAO-B oraz kompleksu TIQ-MAO-B. Nie udało się też wyznaczyć parametrów termodynamicznych reakcji zachodzącej pomiędzy TIQ a MAO-B. Konieczne jest więc podjęcie dalszych badań w tym zakresie, umożliwiających znalezienie właściwych warunków krystalizacji kompleksu TIQ-MAO-B oraz opracowanie odpowiedniej strategii eksperymentu ITC przydatne do opisanego charakteru oddziaływania między białkiem a ligandem.

Podsumowując, wykazano iż 1,2,3,4-tetrahydroizochinolina posiada aktywność przeciwdepresyjną w zwierzęcych modelach depresji. Przeprowadzona analiza biochemiczna ściśle potwierdza te właściwości. Mechanizm działania przeciwdepresyjnego TIQ związany jest głównie z aktywacją układów monoaminergicznych w OUN. TIQ, jako odwracalny inhibitor MAO, prowadzi do podniesienia stężenia neurotransmiterów: DA, NA i 5-HT w mezo limbicznych i pozapiramidowych strukturach mózgu. Ponadto, TIQ wykazuje także właściwości hamowania wychwytu zwrotnego monoamin oraz zdolność zmiatania wolnych rodników, która związana jest ściśle z jej strukturą chemiczną.

W tym świetle, badana amina dobrze rokuje jako potencjalny lek przeciwdepresyjny o właściwościach przeciwutleniających i neuroprotektoryjnych pomocnych w zwalczaniu procesów zapalnych, w leczeniu depresji. Poznanie optymalnych warunków krystalizacji kompleksu TIQ-MAO-B i przeprowadzenie efektywnych pomiarów ITC dałoby możliwość poznania charakteru oddziaływań liganda z białkiem i w konsekwencji mogłoby pozwolić na uzyskanie związku o potencjalnie lepszej skuteczności przeciwdepresyjnej.