



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

mgr farm. Natalia Malikowska-Racia

**Poszukiwanie nowych możliwości farmakoterapii
zespołu stresu pourazowego**

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Farmakodynamiki

Wydziału Farmaceutycznego

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Promotor: Prof. dr hab. Kinga Sałat

Kraków, 2020

Streszczenie

Terapia zespołu stresu pourazowego (*ang. posttraumatic stress disorder, PTSD*) jest postępowaniem łączącym psychoterapię i farmakoterapię. Ta ostatnia wykorzystuje głównie leki przeciwdepresyjne i jest skuteczna u ok. 30% leczonych pacjentów.

Celem pracy było wskazanie leków i związków, które hamują rozwój PTSD-podobnego fenotypu u myszy CD-1. Objawy PTSD, jak i odpowiadające im zachowania gryzoni, są procesami zbliżonymi ewolucyjnie i są charakterystyczne dla wszystkich ssaków (np. proces warunkowania klasycznego, czy aktywacja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza). W związku z tym ich tożsama interpretacja wydaje się uzasadniona, a leki aktywne w modelach zwierzęcych stanowią grupę potencjalnych kandydatów do przyszłych badań klinicznych.

Do indukcji rozwoju PTSD-podobnego fenotypu zastosowano procedurę pojedynczego przedłużonego stresu (mSPS), która odzwierciedla stres związany z traumatycznym przeżyciem i powoduje zmiany odpowiadające wybranym neuropatologiom PTSD. Zbadano wpływ kilkunastu związków na te typy zachowań myszy CD-1, które bezpośrednio korelują z symptomatologią PTSD przedstawioną w DSM-5: reakcję zwierząt w teście warunkowania reakcji strachu (FC), reakcję na stres w teście wymuszonego pływania (FST) oraz strategię eksploracji uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM). Dodatkowo, w wybranych eksperymentach oceniono wpływ procedury mSPS i badanych związków na wokalizację ultradźwiękową myszy i ich zachowanie w teście czterech płytek (FPT). W opisanych eksperymentach zwierzęta poddawano kilku powtarzanym testom, aby odzwierciedlić dynamikę zmian spotykaną w warunkach klinicznych. Zbadano również, czy leki wykazujące najsilniejszą aktywność u samców myszy CD-1 są równie skuteczne u samic oraz określono, jak leki te wpływają na poziom kortykosteronu, testosteronu i estradiolu w osoczu krwi samców i samic myszy przy użyciu immunoenzymatycznej techniki *sandwich* ELISA.

W pracy wykazano, że procedura mSPS, oprócz wpływu na ww. zachowania gryzoni, może zwiększać liczbę wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych przez myszy. Procedura mSPS powoduje wzrost ekspresji warunkowanej reakcji strachu niezależnie od płci, aczkolwiek w różny sposób

wpływa na stężenie kortykosteronu w osoczu krwi: u samców obserwowano przejściowy spadek a następnie wzrost stężenia kortykosteronu, podczas gdy u samic obserwowano odwrotny efekt.

Wykazano, że leki przeciwdepresyjne, tj. wenlafaksyna (10 mg/kg) i bupropion (20 mg/kg), posiadają potencjalną aktywność przeciwdepresyjną w teście FST u samców myszy poddanych procedurze mSPS. Bupropion wykazał także potencjalny efekt anksjolityczny w EPM. Po podaniu ketaminy (25 mg/kg) i tiagabiny (10 mg/kg) obserwowano potencjalny efekt przeciwdepresyjny w teście FST u samców myszy eksponowanych na procedurę mSPS. Tylko tiagabina wykazała potencjalny efekt przeciwłękowy w teście czterech płytek (FPT). Buspiron (2 mg/kg) istotnie skracał czas trwania reakcji zamierania w teście FC i wykazał potencjalną aktywność przeciwłękową w teście EPM, ale nie wykazał aktywności w teście FST. Agoniści receptorów dopaminergicznych podrodziny D₂, tj. pramipeksol (1 mg/kg) i rotigotyna (10 mg/kg), wykazali potencjalny efekt przeciwdepresyjny w teście FST i skracali czas trwania reakcji zamierania w teście FC. Agonista receptorów mGlu_{2/3}, LY354740 (10 mg/kg), wykazał potencjalny efekt przeciwłękowy w teście EPM, podczas gdy antagonistą tych receptorów, LY341495 (5 mg/kg), oprócz aktywności w EPM, wykazał działanie potencjalnie przeciwdepresyjne i istotnie skracał czas trwania reakcji zamierania w teście FC. Do badań na samicach myszy CD-1 wybrano dwa leki wykazujące najsilniejszą aktywność w mysim modelu PTSD: pramipeksol i tiagabinę. Trzynastodniowe podanie tych leków istotnie skracało czas trwania reakcji zamierania u samic eksponowanych na procedurę mSPS, podczas gdy u samców taki efekt wykazał jedynie pramipeksol. Tiagabina i pramipeksol w różny sposób wpływały na stężenia badanych hormonów u samców i samic myszy.

Inne badane związki: klonidyna, dihydrekzydyna i bromokryptyna nie wykazały istotnej aktywności w mysim modelu PTSD. Z kolei obserwowana aktywność modafinilu mogła być wynikiem fałszywie pozytywnym, wynikającym z agitacji psychomotorycznej wywołanej przewlekłym podaniem tego leku.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują, iż w kontekście poszukiwania nowych możliwości farmakoterapii PTSD, szczególną uwagę należy zwrócić na agonistów receptorów dopaminergicznych, tj. niektóre leki stosowane obecnie w chorobie Parkinsona (np. pramipeksol, rotigotyna) oraz

leki, które poprzez hamowanie wychwytu zwrotnego GABA nasilają neurotransmisję GABA-ergiczną (lek przeciwpadaczkowy – tiagabina). Leki te wykazały silną aktywność w mysim modelu PTSD. Należy jednak zaznaczyć, iż w przypadku tiagabiny aktywność ta różniła się u samic i samców, na co należy zwrócić szczególną uwagę w przyszłych badaniach.

Abstract

The therapy of posttraumatic stress disorder (PTSD) combines psychotherapeutic and pharmacological approaches. Current pharmacotherapy, which includes antidepressant drugs merely, is effective in about 30% of patients.

Experiments presented in the dissertation thesis aimed to indicate drugs that reduce PTSD-like behavior in a mouse model. Core symptoms of PTSD, as well as corresponding animal behavior, depend on homologous processes common for all mammals; hence animal models are a reasonable source of knowledge in this field.

The single prolonged stress procedure in mice was used (mSPS) to induce PTSD-like symptoms. It resembles traumatic stress, reflects selected neuropathologies of PTSD, and evokes rodent behavior that corresponds to DSM-5 symptomatology of PTSD: prolongs freezing response in the fear conditioning paradigm (FC), prolongs immobility time in the forced swim test (FST) and change mouse behavior in the elevated plus maze test (EPM) that suggests anxiety-like behavior. The efficacy of drugs was evaluated in male CD-1 mice in the assays mentioned above. Some experiments included the analysis of mouse ultrasonic vocalizations. In all experiments, mice were repeatedly exposed to several tests to reflect the dynamics of clinical conditions.

PTSD occurs twice more often in women, so the most potent medications (pramipexole and tiagabine) were selected, and their effect in FC in female CD-1 mice was assessed. The impact of these drugs and mSPS on serum corticosterone, estradiol, and testosterone levels were evaluated with the use of immunoassay ELISA technique.

Presented results confirm that the mSPS procedure mimics PTSD-like symptomatology and indicates that it may increase the number of mouse ultrasonic vocalizations. It also induces sex-independent prolongation of freezing response in FC, though differently affect corticosterone serum level in male and female mice; in males, a transient decrease and then increase in corticosterone level was observed, while in females the opposite effect was noticed.

Venlafaxine (10 mg/kg) and bupropion (20 mg/kg) produced antidepressant-like effect in male mice in mSPS conditions. Bupropion also produced an anxiolytic-like effect in EPM. Tiagabine (10 mg/kg) presented the

antidepressant-like effect in FST and anxiolytic-like effect in EPM, while ketamine (25 mg/kg) was solely effective in FST. Buspirone (2 mg/kg) reduced freezing in FC and revealed anxiolytic-like effect in EPM, but remained ineffective in FST. Agonists of D₂-like receptors, i.e., pramipexole (1 mg/kg) and rotigotine (10 mg/kg) demonstrated a potent effect in FST and FC, but not in EPM. The agonist of mGluR_{2/3} receptors, LY354740 (10 mg/kg), was active in EPM only, while the antagonist, LY341495 (5 mg/kg), also revealed an antidepressant-like effect in FST and reduced freezing in FC. Pramipexole reduced freezing regardless of a mouse sex, whereas tiagabine was effective only in females. Both drugs differentially affected serum levels of corticosterone, estradiol, and testosterone.

Altogether, the results indicate that some medications that are currently used in the treatment of Parkinson's disease (pramipexole) and antiepileptics which enhance GABA-ergic neurotransmission (tiagabine) are worth further evaluations in terms of their potential repositioning to PTSD. Moreover, current work highlights that sex may significantly affect the efficacy of treatment, hence future studies should take this issue into account.