

Streszczenie

Schizofrenia jest wyniszczającą chorobą psychiczną dotykającą około 1% populacji ludzkiej. Choroba ta charakteryzuje się występowaniem trzech grup objawów: pozytywnych, negatywnych i kognitywnych, którym często towarzyszą zaburzenia depresyjne i lękowe, utrudniające terapię, pogarszające stan kliniczny pacjenta i rokowania. Dostępna farmakoterapia nie spełnia oczekiwań w zakresie leczenia zaburzeń kognitywnych oraz afektywnych występujących u chorych na schizofrenię. Obiecującym uzupełnieniem terapii przeciwpsychotycznej wydają się być ligandy receptora 5-HT₆. Liczne badania przedkliniczne sugerują, że zarówno agoniści, jak i antagoniści tego receptora, wykazują aktywność prokognitywną, przeciwdepresyjną i przeciwłękową u gryzoni.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu dołączenia selektywnego agonisty (WAY-181187, 3 mg/kg i.p.) i antagonisty (SB-742457, 3 mg/kg i.p.) receptora 5-HT₆ na efekt działania wybranych leków przeciwpsychotycznych (LPP), tj. haloperidolu (0,5 mg/kg i.p.), risperidonu (0,2 mg/kg i.p.) i olanzapiny (5 mg/kg i.p.), w badaniach *in vivo* i *ex vivo* u szczurów. Związki podawano oddzielnie i w kombinacjach, jednokrotnie i wielokrotnie (przez 17-22 dni). W ramach badań behawioralnych oceniono wpływ związków na zaburzone MK-801 funkcje pamięci rozpoznawczej w teście rozpoznawania nowego obiektu (NORT), pamięci roboczej w teście spontanicznej zmienności zachowania w labiryncie Y (Y-SAT) i pamięci socjalnej w teście socjalnych interakcji (SIT). Ponadto oceniono ich potencjalne działanie przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania (FST) i przeciwłękowe w testach uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) i konfliktu wg Vogla. Badania *ex vivo* obejmowały ocenę wpływu badanych związków i ich połączeń na poziom neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) i ekspresję jego genu w hipokampie i korze przedczołowej (PFC) z wykorzystaniem techniki Western blot oraz RT-qPCR.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że ligandy receptora 5-HT₆ w różnorodny sposób modyfikowały wpływ wybranych LPP na deficyty poszczególnych rodzajów pamięci indukowane podaniem MK-801 u szczurów. W zakresie poprawy pamięci rozpoznawczej mierzonej w NORT, pozytywny efekt obserwowano w przypadku jednorazowego, łącznego podania olanzapiny i SB-742457. Nieco słabsze i nieistotne statystycznie działanie obserwowano po łącznym podaniu tego LPP z agonistą. Niekorzystne działanie przewlekle stosowanego haloperidolu zostało osłabione podaniem SB-742457. WAY-181187, podany jednorazowo, istotnie poprawił efekt olanzapiny w zakresie pamięci

roboczej. Natomiast obydwie ligandy receptora 5-HT₆ w podobny sposób osłabiały niekorzystne działanie jednokrotnie podanego haloperidolu na pamięć socjalną mierzoną w SIT. Najslabiej zaznaczone korzyści obserwowano po skojarzonym podaniu obu ligandów receptora 5-HT₆ z risperidonem, obserwując brak wpływu na efekty tego LPP, prawdopodobnie ze względu na istotne, korzystne działanie samego neuroleptyku, zwłaszcza w zakresie pamięci rozpoznawczej i roboczej. Nie zanotowano bezpośredniej korelacji pomiędzy wpływem badanych związków i ich połączeń na procesy poznawcze a poziomem BDNF i ekspresją jego genu w hipokampie i PFC szczurów. Należy jednak uwzględnić, że większość pozytywnych efektów obserwowano po jednorazowym podaniu badanych substancji i ich połączeń, natomiast zmiany w szlaku sygnalizacyjnym BDNF mierzono po ich podaniach wielokrotnych.

Dodatkowo ligandy receptora 5-HT₆ w różny sposób wpływały na efekty wybranych LPP mierzone w behawioralnych testach oceniających potencjalną aktywność przeciwdepresyjną i przeciwłkową. Dołączenie jednorazowe i wielokrotne agonisty i antagonisty receptora 5-HT₆ do olanzapiny nie miało istotnego wpływu na zachowanie depresyjne i lękowe zwierząt w zastosowanych testach. WAY-181187 przyczynił się do zniesienia prodepresyjnego działania przewlekle stosowanego haloperidolu i ujawnienia efektu przeciwdepresyjnego po łącznym podaniu obu substancji, a także osłabienia anksjogennego działania LPP w teście konfliktu wg Vogla. Zarówno WAY-181187, jak i SB-742457, podane wielokrotnie i łącznie z risperidonem, ujawniły działanie przeciwłkowe. Wydaje się, że korzystne, anksjolityczne efekty dołączenia ligandów receptora 5-HT₆ do haloperidolu i risperidonu zależą od rodzaju reakcji lękowej w zastosowanym teście. WAY-181187 poprawiał działanie LPP w modelu lęku warunkowanego bodźcem awersyjnym (test konfliktu wg Vogla) szczególnie po podaniu jednorazowym, podczas gdy dodatek SB-742457 do risperidonu, zarówno jedno-, jak i wielokrotny, ujawnił jego aktywność przeciwłkową w modelu opartym na naturalnej reakcji lękowej gryzoni (EPM). Nie stwierdzono prostej korelacji pomiędzy wpływem badanych związków i ich połączeń na poziom BDNF i ekspresję jego genu w hipokampie i PFC szczurów a efektami obserwowanymi w eksperymentach behawioralnych. Najprawdopodobniej szlak sygnalizacyjny BDNF nie jest jedynym mechanizmem związanym z prezentowaną aktywnością przeciwdepresyjną i/lub przeciwłkową badanych substancji i ich połączeń.

Na podstawie uzyskanych wyników behawioralnych i biochemicznych trudno jednoznacznie stwierdzić, czy dodanie selektywnego agonisty czy antagonisty receptora 5-HT₆ będzie lepiej służyć w poszerzeniu aktywności farmakologicznej LPP. Efekt ten wydaje się zależeć od stanu klinicznego pacjenta i profilu farmakologicznego/terapeutycznego

zastosowanego LPP. Dodatkową wartością przedstawionych badań jest poszerzenie wiedzy na temat aktywności farmakologicznej selektywnych ligandów receptora 5-HT₆. Wykazano, że zarówno agonista, jak i antagonistę receptora 5-HT₆, podawane jednorazowo i wielokrotnie, zapobiegają zaburzeniom pamięci indukowanym przez MK-801 u szczurów, wykazując niejednorodny wpływ na poszczególne jej domeny. Wydaje się, że zaangażowanie szlaków sygnałowych BDNF może być jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za prokognitywne działanie wielokrotnie podanych agonisty i antagonisty, ale nie jedynym. Podobne skutki działania agonisty i antagonisty mogą być związane z ich wpływem na alternatywne ścieżki sygnałowe sprzężone z receptorami 5-HT₆. Ponadto, w zastosowanej dawce tylko WAY-181187 wykazał potencjalne działanie przeciwdepresyjne po jednorazowym podaniu.

Wyniki otrzymanych badań potwierdzają słuszność prowadzenia badań mających na celu poszukiwanie nowych rozwiązań farmakologicznych zwiększających bezpieczeństwo i spektrum działania leków stosowanych w terapii schizofrenii.

Abstract

Schizophrenia is a debilitating mental illness that affects approximately 1% of the human population. This disease is characterized by the presence of three groups of symptoms: positive, negative and cognitive, often accompanied by depression and anxiety, making therapy difficult, worsening patient's clinical condition and prognosis. The available pharmacotherapy still fails to meet expectations in the treatment of cognitive and affective symptoms in patients with schizophrenia. 5-HT₆ receptor ligands seem to be a promising addition to antipsychotic therapy. Numerous preclinical studies suggest that both agonists and antagonists of this receptor exhibit potential procognitive, antidepressant and anxiolytic activities in rodents.

The aim of this study was to assess effects of combined administration of a selective agonist (WAY-181187, 3 mg/kg i.p.) or antagonist (SB-742457, 3 mg/kg i.p.) of the 5-HT₆ receptor with selected antipsychotic drugs (APD), i.e. haloperidol (0,5 mg/kg i.p.), risperidone (0,2 mg/kg i.p.) and olanzapine (5 mg/kg i.p.), in *in vivo* and *ex vivo* studies in rats. Compounds were administered separately and in combination, once and repeatedly (for 17-22 days). Behavioral studies assessed the effect of the tested compounds on different cognitive functions disturbed by MK-801, i.e. recognition memory in the novel object recognition test (NORT), working memory in the Y-maze spontaneous alteration test (Y-SAT) and social memory in the social interaction test (SIT). In addition, their potential antidepressant (in the forced swim test (FST)) and anxiolytic (in the elevated plus maze (EPM) and Vogel conflict drinking tests) activities were assessed. *Ex vivo* studies included the assessment of the effect of the tested compounds and their combinations on the level of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and its gene expression in the hippocampus and prefrontal cortex (PFC) using the Western blot technique and RT-qPCR.

Based on the obtained results, it can be concluded that 5-HT₆ receptor ligands modified the effect of selected APD on the deficits of particular types of memory induced by MK-801 administration in rats in various ways. In terms of the improvement of recognition memory, measured in NORT, a positive effect was observed in the case of a single, combined administration of olanzapine and SB-742457. Slightly weaker and insignificant effects were observed after the combined administration of this APD with an agonist. The effect of chronically used haloperidol was also improved by the administration of SB-742457. WAY-181187, given once, significantly improved the effect of olanzapine in terms of working memory. On the other hand, both ligands of the 5-HT₆ receptor similarly attenuated the adverse

effect of acute haloperidol on social memory measured in SIT. The weakest benefit was observed after the combined administration of both 5-HT₆ receptor ligands with risperidone, noting their lack of influence on the effects of this APD, probably due to the significant precognitive effect of the neuroleptic itself, especially in terms of recognition and working memory. No direct correlation was observed between the influence of the tested compounds and their combinations on cognitive processes and the level of BDNF and its gene expression in the hippocampus and PFC of rats. Such a conclusion should be made due to the fact that most of the positive effects were determined after a single administration of the studied substances and their combinations, while changes in the BDNF signaling pathway were measured after their repeated administrations.

In addition, ligands of the 5-HT₆ receptor differently influenced the effects of selected APD measured in behavioral tests assessing potential antidepressant and anxiolytic activities. The addition of single and multiple 5-HT₆ receptor agonist and antagonist to olanzapine had no significant effect on the depressive and anxiety behavior of animals in the tests used. WAY-181187 contributed to the abolition of the pro-depressive effect of chronic haloperidol and the disclosure of the antidepressant effect after the combined administration of both substances, as well as the reduction of its anxiogenic effect in the Vogel conflict drinking test. Both WAY-181187 and SB-742457, administered repeatedly and in combination with risperidone, revealed an anxiolytic effect. The beneficial anxiolytic effects of adding 5-HT₆ receptor ligands to haloperidol and risperidone seem to depend on the type of anxiety response modelled in the test. WAY-181187 improved the action of APD in the model of anxiety conditioned by the aversive stimulus (Vogel conflict drinking test), especially after a single administration. While the addition of SB-742457, both acute and chronic to risperidone, revealed its anxiolytic activity in a model based on the "natural" rodent anxiety response (EPM). There was no simple correlation between the influence of the tested compounds and their combinations on the BDNF level and expression of its gene in the hippocampus and PFC of rats, and the effects observed in behavioral experiments. Most likely, the BDNF signaling pathway is not the only mechanism associated with the demonstrated antidepressant and/or anxiolytic activity of the tested substances and their combinations. On the basis of the obtained behavioral and biochemical results, it is difficult to clearly determine whether the addition of a selective 5-HT₆ receptor agonist or antagonist will be better for extending the pharmacological activity of APD. This effect seems to depend on the clinical condition of a patient and the pharmacological/therapeutic profile of APD used.

An additional value of the obtained findings is the broadening of the knowledge about pharmacological activity of selective 5-HT₆ receptor ligands. Both 5-HT₆ receptor agonist and antagonist, administered once and chronically, prevent memory deficits induced by MK-801 in rats, showing a heterogeneous effect on its individual domains. It appears that the involvement of BDNF signaling pathways may be one of the mechanisms responsible for the procognitive action of repeatedly administered the agonist and the antagonist, but not the only one. Rather, similar agonistic and antagonistic effects may be related to their effects on alternative signaling pathways linked to 5-HT₆ receptors. Moreover, at the dose used, only WAY-181187 showed a potential antidepressant effect after a single administration.

The obtained results confirm the validity of conducting research aimed at searching for new pharmacological/therapeutic solutions increasing the safety and spectrum of action of drugs used in the treatment of schizophrenia.