Charakterystyka selektywności funkcjonalnej nowych agonistów receptora serotoninowego typu 5-HT_{1A}

Monika Głuch-Lutwin

Streszczenie

Receptor serotoninowy 5-HT_{1A} odgrywa istotną role w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych w organizmie człowieka. Poszukiwanie aktywnych ligandów tych receptorów stwarza więc szanse rozwoju nowych, skutecznych terapii. Niestety, dostępne dotychczas substancje psychoaktywne nie rozróżniają receptorów 5-HT_{1A} zlokalizowanych w różnych częściach mózgu i odpowiadających za zróżnicowane i często przeciwstawne efekty, przez co ich pobudzenie nie pozwala na osiągnięcie maksymalnych możliwości terapeutycznych. Badania ostatnich lat przyczyniły się do lepszego poznania budowy i funkcji receptorów metabotropowych, między innymi dzięki pracom nad zjawiskiem selektywności funkcjonalnej. Związki wykazujące preferencje sygnalizacyjne mogą być szczególnie interesujące ze względu na potencjalnie działanie terapeutyczne i ograniczone efekty niepożądane.

Celem badań *in vitro* w ramach rozprawy doktorskiej była poszerzona charakterystyka selektywności funkcjonalnej związków wzorcowych (serotonina, buspiron, 8-OH-DPAT, 5- karboksyamidotryptamina, aripiprazol), związków modelowych (F15599, F13714, befiradol) oraz 54 związków innowacyjnych o wysokim powinowactwie do receptora 5-HT_{1A} (podzielonych na trzy serie). Charakterystyka funkcjonalna objęła przede wszystkim badania wypływu związków na kluczowe elementy sygnalizacji komórkowej, czyli produkcję cAMP, fosforylację ERK1/2, mobilizację Ca^{2+} i rekrutację β-arestyny, a także aktywacji kanałów potasowych GIRK. Badania te zostały przeprowadzone przy użyciu ciągłych linii komókowych CHO-K1 h5-HT_{1A} oraz U2OS h5- HT_{1A}. Przebadane związki charakteryzowały się w większości silnymi właściwościami agonistycznymi wobec receptora 5-HT_{1A}.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że selektywność funkcjonalną można nie tylko zidentyfikować wśród związków opisanych w literaturze (np. F15599) ale istnieje także możliwość zaprojektowania nowych struktur o charakterze stronnicznych agonistów. Badania tego typu przeprowadzone poraz pierwszy na większej grupie związków pozwoliły na sformułowanie zależności struktura-selektywność funkcjonalna agonistów receptora 5- HT_{1A}, a także na pionierskie uzyskanie licznych i zróżnicowanych profili funkcjonalnych. Opisano ligandy o wyższej niż wcześniej selektywności funkcjonalnej wobec fosforylacji ERK1/2 (co ma szczególne znaczenie w kontekście aktywności przeciwdepresyjnej), a także po raz pierwszy ligandy o wyraźnej preferencji względem rekrutacji β-arestyny. Na szczególną uwagę zasługuje związek innowacyjny oznaczony kodem NLX-204, który wykazał się seletktywnością funkcjonalną wobce fosforylacji ERK1/2 oraz bardzo korzystnymi właściwościami lekopodobnymi, a także związek NLX-249, o niezwykle wysokiej preferencji wobec rekrutacji β-arestyny (około 4 rzędów wielkości). Związki takie niosą zarówno potencjał terapeutyczny, jak i mogą stanowić cenne narzędzia farmakologiczne w badaniach nad rolą receptorów 5-HT_{1A} oraz znaczeniem selektywności funkcjonalnej.

W drugiej części pracy opisano badania *in vivo*, które objęły określenie potencjalnych właściwości przeciwdepresyjnych czterech wybranych stronniczych agonistów receptora 5-HT_{1A} (związków modelowych F13714, F15599, befiradolu oraz związku innowacyjnego NLX-204), zarówno u myszy naiwnych, jak i po raz pierwszy dla tego typu ligandów, w mysich modelach depresji, wywołanej podaniem kortykosteronu oraz

chronicznym łagodnym nieprzewidywalnym stresem. Dokonano także oceny wpływu badanych związków na proces konsolidacji śladów pamięciowych w teście rozpoznawania nowego obiektu.

Wyniki badań uzyskane na myszach naiwnych sugerują, że wszystkie związki charakteryzuje wyraźne działanie „przeciwdepresyjne" w teście wymuszonego pływania, a także brak wpływu na aktywność lokomotoryczną myszy w najniższych dawkach aktywnych. Ponadto, F15599 nie wykazywał negatywnego wpływu na procesy poznawcze w żadnej z zastosowanych dawek. Kontrastujące wyniki uzyskano dla befiradolu, który we wszystkich badanych dawkach negatywnie wpływał na proces konsolidacji pamięci. F13714 nie wpływał na proces konsolidacji pamięci tylko w jednej badanej dawce (2 mg/kg). Z kolei innowacyjny związek NLX-204 powodował upośledzenie pamięci tylko w wyższych dawkach. Warto zauważyć, że relatywnie lepsze wyniki w tym teście zaobserwowano dla związków, które wykazywały wyższą preferencję względem stymulacji fosforylacji ERK1/2, względem innych ścieżek sygnalizacji.

W modelu chronicznego nieprzewidywalnego łagodnego stresu, wykazano, że pojedyncze podanie F15599, F13714 oraz befiradolu znosiło wydłużony czas bezruchu w teście wymuszonego pływania w porównaniu ze stresowaną grupą, ale nie było wystarczające do złagodzenia zachowań podobnych do anhedoni, co oceniono na podstawie spożycia ilości sacharozy. U myszy testowanych w modelu depresji spowodowanym podaniem kortykosteronu, zauważono, że jednorazowe podanie F15599, befiradolu oraz NLX-204 skracało istotnie statystycznie czas bezruchu myszy względem grupy kontrolnej otrzymującej kortykosteron. Dodatkowo, befiradol oraz NLX-204 zwiększał spożycie sacharozy, poprawiając tym samym zdolność zwierząt do odczuwania przyjemności.

W badaniach *ex vivo* oznaczono poziomu białek pCREB, pERK1/2 w korze przedczołowej i hipokampie izolowanych po badaniach w dwóch modelach depresji. W modelu nieprzewidywalnego przewlekłego łagodnego stresu wykazano, że w hipokampie związki badane (poza befiradolem) odwracały deficyty pERK1/2. W korze przedczołowej zbadano, że befiradol zwiększał poziom pERK1/2. Co ciekawe, wpływ F15599 w korze przedczołowej był znacznie wyraźniejszy niż w przypadku F13714 czy NLX-204. U myszy, którym przewlekle podawano kortykosteron, zaobserwowano, że podanie F15599, F13714 i NLX-204 istotnie statystycznie zwiększało poziom pERK1/2 w hipokampie. Efektu tego nie zaobserwowano w korze przedczołowej. Żaden z badanych związków, niezależnie od struktury mózgu, w obydwóch modelach depresji nie wpływał na poziom pCREB.