

Mgr inż. Barbara Kosmowska

Zakład Neuropsychofarmakologii

Instytut Farmakologii PAN, Kraków

Promotor: **dr hab. Jadwiga Wardas**, prof. IF PAN, Kraków

Recenzenci: **dr hab. Agata Adamczyk**, prof. IMDiK PAN (Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, IMDiK PAN, Warszawa)

prof. dr hab. n. med. Przemysław Nowak (Zakład Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Opolski, Opole)

Poszukiwanie potencjalnej terapii drżenia samoistnego; badania ligandów receptorów dopaminowych i adenozynowych w modelu harmalinowym u szczurów

1. Streszczenie w języku polskim

Drżenie samoistne (ET) jest jednym z najczęstszych zaburzeń ruchowych w populacji osób starszych, które objawia się głównie silnymi, obustronnymi, pozycyjnymi i czynnościowymi drżeniami obu kończyn górnych o częstotliwości w zakresie 4-12 Hz, które wraz z wiekiem i postępem choroby uniemożliwiają choremu wykonywanie najprostszych czynności życia codziennego. Leczenie pacjentów z ET opiera się przede wszystkim na terapii farmakologicznej (propranolol, prymidon), która często powoduje jednak szereg efektów ubocznych, a w ponad 30% przypadków nie przynosi poprawy. Dlatego też wysoce uzasadnionym wydaje się być prowadzenie badań mających na celu poszukiwanie nowych punktów uchwytu terapeutycznego w leczeniu ET.

Badania podstawowe obejmują doświadczenia w zwierzęcych modelach tej choroby. Jednym z najbardziej uznanych modeli ET są drżenia wywołane farmakologicznie przez jednorazowe, obwodowe podanie harmaliny. Harmalina to związek pochodzenia roślinnego, pochodna alkaloidu β -karboliny, która u zwierząt wywołuje zależne od dawki drżenia o częstotliwości zbliżonej do ET (u szczurów 10-12 Hz). W świetle dotychczasowej wiedzy wydaje się, że obwody neuronalne odpowiedzialne za drżenia harmalinowe obejmują głównie szlaki glutaminianergiczne. Wykazano jednak, że na pobudliwość neuronów mózdku, który obok jąder dolnej oliwki (ION), jąder motorycznych wzgórza (VA/VL) i kory motorycznej uczestniczy w rozprzestrzenianiu się drżeń zarówno w przebiegu ET jak i w modelu

harmalinowym, wpływają również inne neuroprzekaźniki czy neuromodulatory, m.in. dopamina i adenozyne.

Celem niniejszej pracy było w pierwszej kolejności opracowanie i weryfikacja eksperymentalnego modelu ET u szczurów w postaci drżeń harmalinowych, mierzonych w sposób w pełni zautomatyzowany przy użyciu aparatów *Force Plate Actimeters* (FPA) oraz poszukiwanie roli układu glutaminianergicznego w tym zjawisku. Kolejnym celem było zbadanie udziału receptorów adenozynowych i dopaminowych w modulacji drżeń harmalinowych, a także poszukiwanie struktur mózgowych zaangażowanych w potencjalne przeciwdrżeniowe działanie ligandów tych receptorów oraz określenie roli układu glutaminianergicznego m.in. w jądrach VA/VL wzgórza w mechanizmie hamowania drżeń pod wpływem agonisty receptorów adenozynowych A₁.

Doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów rasy Wistar Han zgodnie z zaleceniami II Lokalnej Komisji Etycznej działającej przy Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie (nr zgody 1069/2013, aneks 1290/2016). Badania behawioralne rozpoczęto od weryfikacji modelu harmalinowego przy użyciu propranololu, a więc leku pierwszego wyboru w terapii pacjentów z ET. Następnie zbadano wpływ wybranych ligandów receptorów dopaminowych i adenozynowych na drżenia harmalinowe: (1) preferencyjnych agonistów receptorów D₃/D₂ – pramipeksolu i 7-OH-DPAT; selektywnych antagonistów receptorów D₃ – SB-277011-A i SR-21502; nieselektywnego antagonisty receptorów typu D₂ – haloperidolu; antagonisty presynaptycznych receptorów D₂/D₃ – amisulprydu; (2) selektywnego agonisty i antagonisty receptorów A₁ – 5'-Cl-ENBA i DPCPX. Przeprowadzono również badania neurochemiczne i molekularne wpływu harmaliny oraz wybranych ligandów receptorów dopaminowych i adenozynowych na: (1) ogólną aktywność neuronalną mierzoną poziomem ekspresji mRNA dla genu wczesnej odpowiedzi komórkowej zif-268 w wybranych strukturach mózgu; (2) uwalnianie glutaminianu w jądrach VA/VL wzgórza mierzone przy pomocy mikrodializy *in vivo*; (3) poziom ekspresji mRNA dla selektywnych markerów neuronów glutaminianergicznym – pęcherzykowych transporterów glutaminianu vGlut1 i vGlut2.

Badania behawioralne pomiaru intensywności drżeń w aparatach FPA wykazały, że harmalina wywołuje u szczurów uogólnione drżenia całego ciała, które manifestują się wyraźnym zwiększeniem wartości parametru AP2 (moc w zakresie 9-15 Hz; zakres charakterystyczny dla drżeń harmalinowych), obniżeniem wartości parametru AP1 (moc w zakresie 0-8 Hz; ruchy związane głównie z aktywnością lokomotoryczną) i podniesieniem współczynnika drżeń (różnica między AP2 i AP1), a propranolol osłabia drżenia obniżając

podniesione przez harmalinę wartości AP2 i współczynnika drżeń. Badania wpływu harmaliny na ogólną aktywność neuronalną wykazały, że związek ten zwiększa poziom ekspresji mRNA dla genu zif-268 w jądrach dolnej oliwki (ION), korze mózdzku, VA/VL i korze motorycznej. Zaobserwowano również, że harmalina zwiększa poziom zewnątrzkomórkowego glutaminianu w VA/VL oraz nasila ekspresję mRNA dla transportera vGlut1 w ION i osłabia w korze motorycznej.

Preferencyjni agoniści receptorów dopaminowych D₃/D₂, pramipeksol i 7-OH-DPAT, osłabili drżenia wywołane harmaliną, przy czym efekt ten nie uległ odwróceniu pod wpływem żadnego z zastosowanych antagonistów tych receptorów. Ponadto pramipeksol osłabiał nasilony przez harmalinę poziom ekspresji zif-268 mRNA w ION, korze mózdzku i korze motorycznej, ale nie w VA/VL. Natomiast selektywny agonista receptorów A₁, 5'Cl-ENBA hamował drżenia harmalinowe, a efekt ten blokowany był przez antagonistę, związek DPCPX. 5'Cl-ENBA osłabiał zwiększony przez harmalinę poziom ekspresji zif-268 mRNA we wszystkich badanych strukturach, ale działanie agonisty blokowane było przez antagonistę tylko w korze motorycznej. Dodatkowo agonista odwracał efekty harmaliny względem ekspresji vGlut1 mRNA w ION i w korze motorycznej oraz zmniejszał nasilone harmaliną uwalnianie glutaminianu w jądrach VA/VL wzgórza.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że drżenia wywołane harmaliną, mierzone przy pomocy aparatów FPA stanowią dobry i wiarygodny model ET, przydatny w poszukiwaniu związków o przeciwdrżeniowym potencjale. W mechanizmie wywoływania i rozprzestrzeniania się drżeń harmalinowych zaangażowane są takie struktury mózgowie jak ION, kora mózdzku, jądra VA/VL wzgórza i kora motoryczna, a modulacja przekazywania glutaminianergicznego na szlaku ION-mózdzek-wzgórze-kora motoryczna może leżeć u podstaw drżeń w tym modelu.

Pramipeksol i 7-OH-DPAT hamowały drżenia w modelu harmalinowym. Biorąc pod uwagę, że pramipeksol jest zarejestrowanym lekiem przeciwparkinsonowskim, a w badaniach na niewielkiej liczbie pacjentów z ET osłabiał drżenia, wyniki przeprowadzonych eksperymentów behawioralnych potwierdzają jego korzystne działanie w modelu harmalinowym i potencjalne znaczenie w terapii ET. Dodatkowo osłabianie nasilonej przez harmalinę aktywności neuronów ION, kory mózdzku oraz kory motorycznej może być istotne w przeciwdrżeniowym działaniu pramipeksolu, choć dokładne mechanizmy neuronalne leżące u podstaw działania tego leku są nadal niejasne, ze względu na brak wpływu antagonistów receptorów dopaminowych D₃/D₂. Natomiast wyniki badań z wykorzystaniem ligandów receptorów adenozynowych A₁ sugerują, że receptory te mogą być potencjalnym

punktem uchwytu terapeutycznego w leczeniu ET, a u podstaw przeciwdrżeniowego działania 5'Cl-ENBA oprócz obniżenia aktywności neuronalnej w ION, korze mózdzku, wzgórzu i korze motorycznej, leży zmniejszenie uwalniania glutaminianu w jądrach VA/VL wzgórza. Zważywszy jednak na fakt, że aktywacja receptorów A_1 oprócz silnego efektu przeciwdrżeniowego może wywoływać również działania niepożądane, takie jak sedacja, zaburzenia sercowo-naczyniowe czy hipotermia, kliniczne stosowanie agonistów tych receptorów na dzień dzisiejszy wydaje się być ograniczone.

2. Streszczenie w języku angielskim

Essential tremor (ET) is one of the most common movement disorders in the population of elderly people, which is manifested mainly by strong bilateral postural and kinetic tremor of both upper extremities with a frequency range of 4-12 Hz, which together with the age and disease progression make it impossible for patient to do even the simplest activities of everyday life. Treatment of ET patients is primarily based on pharmacological therapy (propranolol, primidone), which may, however, cause a number of side effects and in over 30% of cases does not bring any improvement. Therefore, it seems highly justified to conduct research aimed at finding new targets of therapeutic intervention in the treatment of ET.

One of the most recognized ET models is tremor induced pharmacologically by acute peripheral administration of harmaline. Harmaline is a compound of plant origin, a β -carboline derivative, which in animal produce dose-dependent tremor with frequency similar to these of ET (10-12 Hz rats). Based on current knowledge, it seems that the neuronal circuits responsible for harmaline tremor mainly involve glutamatergic pathways. However, it has been shown that the excitability of neurons of the cerebellum, which in addition to inferior olive nuclei (ION), motor thalamic nuclei (VA/VL) and motor cortex participates in tremor spreading in harmaline model and ET, could be also modulated by other neurotransmitters or neuromodulators, including dopamine and adenosine.

The first aim of the study was to develop and verify an experimental model of ET in rats, the harmaline-induced tremor measured in a fully automated manner using Force Plate Actimeters (FPA), and then to search for the role of the glutamatergic system in this phenomenon. The second goal was to study the role of adenosine and dopamine receptors in modulation of harmaline-induced tremor, as well as search for brain structures involved in potential tremorolytic action of these receptors ligands and determine the role of glutamatergic system (in the VA/VL thalamic nuclei, among others) in the mechanism of tremor inhibition under the influence of adenosine A_1 receptor agonist.

The experiments were performed on male Wistar Han rats according to the recommendations of the 2nd Local Ethical Committee operating at the Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences in Krakow (permission no. 1069/2013, annex no. 1290/2016). The initial behavioral studies were performed to verify harmaline model using propranolol, the first-line drug in treatment of ET patients. Then we tested the influence of different dopamine and adenosine receptor ligands on harmaline-induced tremor: (1) preferential D_3/D_2 receptor agonists – pramipexole and 7-OH-DPAT; selective D_3 receptor

antagonists – SB-277011-A and SR-21502; non-selective D₂ receptor antagonist – haloperidol; presynaptic D₂/D₃ receptor antagonist – amisulpride; (2) selective agonist and antagonist of the A₁ receptors – 5'Cl-ENBA and DPCPX, respectively. We performed also neurochemical and molecular studies to examine the effects of harmaline and selected ligands of dopamine and adenosine receptors on: (1) general neuronal activity measured by the level of mRNA expression for immediate early gene, zif-268 in different brain structures; (2) glutamate release in VA/VL thalamic nuclei by microdialysis *in vivo*; (3) the level of mRNA expression for glutamatergic neurons markers – vesicular glutamate transporters vGlut1 and vGlut2.

Measurement of tremor intensity using FPA devices have shown that harmaline induces generalized tremor of the whole body in rats, manifested in a marked increase in AP2 (power within the frequency band of 9-15Hz; characteristic for harmaline tremor), decrease in AP1 (power within the frequency band of 0-8Hz; characteristic mainly for locomotor activity) and elevation in tremor index (difference in power between AP2 and AP1), while propranolol reduced the tremor by lowering harmaline-increased values of AP2 and tremor index. Studies on general neuronal activity have shown that harmaline increased zif-268 mRNA expression in ION, cerebellar cortex, VA/VL thalamic nuclei and motor cortex. What is more, we observed that harmaline elevated the level of extracellular glutamate in VA/VL nuclei of the thalamus, raised vGlut1 mRNA expression in ION and diminished it in the motor cortex.

Preferential dopamine D₃/D₂ receptor agonists, pramipexole and 7-OH-DPAT, reduced harmaline-induced tremor but this effect was not reversed by any of the antagonists used. In addition, pramipexole attenuated the harmaline-enhanced zif-268 mRNA expression in ION, cerebellar cortex and motor cortex, but not in VA/VL thalamic nuclei. Whereas, the selective agonist of the A₁ receptors, 5'Cl-ENBA inhibited harmaline tremor, and this effect was blocked by DPCPX, the A₁ antagonist. 5'Cl-ENBA reduced the harmaline-increased zif-268 mRNA in all of the structures studied, but the agonist effect was blocked by the antagonist only in the motor cortex. In addition, the agonist reversed harmaline effects on vGlut1 mRNA expression in ION and motor cortex and decreased the harmaline-elevated glutamate release in VA/VL nuclei of the thalamus.

The results of our research indicate that harmaline-induced tremor measured using FPA devices is a good and reliable model of ET, useful in the search for compounds with tremorolytic potential. Furthermore, ION, cerebellar cortex, VA/VL thalamic nuclei and motor cortex seem to be the brain structures involved in the mechanism of harmaline tremor,

and modulation of glutamatergic transmission in ION-cerebellum-thalamus-motor cortex pathway may be involved in propagation of tremor in this model.

Pramipexole and 7-OH-DPAT inhibited harmaline tremor. Considering that pramipexole is a registered antiparkinsonian drug and in the study with a small number of patients with ET it weakened the tremor intensity, the results of our behavioral experiments confirm its beneficial effects in harmaline model and potential significance in ET therapy. In addition, the diminishing of harmaline-elevated neuronal activity in ION, cerebellar cortex and motor cortex may be important for tremorolytic action of pramipexole, although the precise neural mechanisms underlying the observed effects of this drug are still unclear, due to the lack of dopamine D₃/D₂ antagonists action. On the other hand, the results of our studies with adenosine A₁ receptor ligands suggest that these receptors may be a potential target of therapeutic intervention in ET therapy. It seems that at the basis of tremorolytic action of 5'CI-ENBA, in addition to the reduction of neuronal activity in ION, cerebellar cortex, thalamus and motor cortex, there is a decrease in the release of glutamate in the VA/VL nuclei of thalamus. However, taking into account that the activation of A₁ receptors, in addition to a strong tremorolytic action, may also cause side effects such as sedation, cardiovascular problems or hypothermia, the clinical use of these receptor agonists seems to be limited at present.