

mgr Marta Szlachta

Tytuł pracy doktorskiej: „Molekularny mechanizm działania klozapiny w kontekście zaburzeń poznawczych w schizofrenii.”

Promotor: Prof. dr hab. Marta Dziedzicka – Wasylewska

Promotor pomocniczy: dr hab. Agata Faron - Górecka

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Klozapina (CLZ) należy do grupy leków przeciwpsychotycznych drugiej generacji (atypowych) o złożonym profilu receptorowym. W odróżnieniu od typowych neuroleptyków, CLZ charakteryzuje się nie tylko skutecznością w leczeniu objawów wytwórczych, ale również objawów ubytkowych i deficytów poznawczych. Pomimo stosowania CLZ w klinice, mechanizm jej działania nie jest do końca poznany, a długotrwała terapia wiąże się niestety z występowaniem poważnych skutków ubocznych.

Receptory związane z białkami G (ang. G-protein-coupled receptor; GPCR) stanowią jedno z ważniejszych celów działania leków przeciwpsychotycznych, a receptory serotoninowe wydają się ostatnio szczególnie istotne. Wykazano, że aktywacja receptora 5HT1A m.in. łagodzi objawy pozapiramidowe powodowane przez typowe neuroleptyki oraz poprawia zaburzenia poznawcze wywoływane przez antagonistów receptorów NMDA. W przypadku receptora 5HT2A zaobserwowano zwiększone uwalnianie dopaminy w korze mózgowej w momencie jego zablokowania. Natomiast blokada receptorów dopaminowych D2 jest kluczowa w skuteczności leczenia przeciwpsychotycznego, dlatego regulacja tych receptorów ma istotne znaczenie także w działaniu atypowych neuroleptyków. CLZ wykazuje powinowactwo do receptorów dopaminowych D2 i serotoninowych 5HT1A i 5HT2A, dlatego – zwłaszcza w kontekście szeroko omawianej w literaturze koncepcji heterodimeryzacji GPCR – oddziaływanie pomiędzy tymi receptorami może mieć udział w mechanizmie jej działania. Często używaną substancją modelującą zaburzenia poznawcze u zwierząt jest ketamina będąca antagonistą receptorów NMDA, ale wykazującą także powinowactwo do receptorów dopaminowych D2 i serotoninowych 5HT2A.

W związku z powyższym, w niniejszej pracy doktorskiej postanowiono zbadać behawioralne efekty CLZ oraz podjęto próbę znalezienia zmian na poziomie biochemicznym,

które korelowałyby z efektami behawioralnymi tego leku. W szczególności zbadano wpływ CLZ na gęstość i biosyntezę receptorów dopaminowych D2 oraz na kolokalizację i heterodimeryzację następujących par receptorów: D2-5HT1A i 5HT1A-5HT2A.

Aby zbadać zdolność CLZ do łagodzenia deficytów poznawczych wykorzystano ketaminowy model zaburzeń kognitywnych w celu ich wywołania u gryzoni i test przerzutności uwagi (ang. Attentional Set Shift Task; ASST), pozwalający ocenić elastyczność uwagi. Testowano dwie dawki CLZ (0,3 i 1 mg/kg) w paradygmacie podań ostrych i wielokrotnych. Przeprowadzone doświadczenia behawioralne wykazały, że CLZ w dawce 0,3 mg/kg podawana zarówno jednokrotnie jak i wielokrotnie, odwracała zaburzenia poznawcze wywołane przez ketaminę podawaną w dawce 20 mg/kg, co było obserwowane jako mniejsza liczba powtórzeń potrzebnych do ukończenia kluczowej fazy testu ASST, czyli fazy dyskryminacji między-wymiarowej (EDS). Natomiast CLZ podawana wielokrotnie w dawce 1 mg/kg nasilała deficyty kognitywne (Szlachta et al., 2017). Dwie dawki CLZ zastosowano z uwagi na poprzednie wyniki badań *in vitro*, które wykazały wpływ CLZ na heterodimeryzację receptorów GPCR zależny od stężenia tego leku w medium hodowlanym oraz od czasu inkubacji (Faron – Górecka et al., 2008).

Metodą pozwalającą ocenić poziom oddziaływania pomiędzy receptorami w tkance natywnej była technika ligacji zbliżeniowej (ang. Proximity Ligation Assay, PLA). Analiza sygnału PLA wykazała, że jednokrotne podania leków nie wpływają na poziom interakcji pomiędzy badanymi receptorami w korze przedczołowej (PFC) i czołowej (Cx) myszy. Wielokrotne podania CLZ w niższej dawce (0,3 mg/kg) skutkowały wzrostem poziomu heterodimeryzacji obu par receptorów w badanych strukturach mózgowych. Wyższa dawka CLZ (1mg/kg) nie wpływała na poziom interakcji między badanymi receptorami, natomiast KET powodowała wzrost poziomu tylko w przypadku heterodimerów 5HT1A – 5HT2A w PFC i Cx. Uzyskane wyniki niewątpliwie świadczą o wpływie CLZ na heterodimery GPCR, natomiast nie tłumaczą efektów obserwowanych w eksperymentach behawioralnych.

Z związku z doniesieniami sugerującymi możliwą interakcję pomiędzy systemami NMDA i dopaminergicznym w aspekcie zmian poznawczych zbadano również wpływ CLZ na receptory dopaminowe D2. Wykorzystano w tym celu analizę autoradiograficzną, bazującą na wiązaniu znakowanego trytem [³H]domperidonu do receptora dopaminowego D2 oraz hybrydyzację *in situ*, pozwalającą na pomiar poziomu mRNA kodującego ten receptor. Analiza otrzymanych wyników sugeruje wzrost poziomu biosyntezy pre-synaptycznych receptorów dopaminowych D2 na skutek wielokrotnego podawania CLZ. Zaobserwowano bowiem wzrost

poziomu tych receptorów w brzusznej i przyśrodkowej części prążkowiec, natomiast w polu brzusznej nakrywki (VTA) wykazano wzrost poziomu mRNA kodującego receptor D2.

Otrzymane rezultaty niewątpliwie dostarczają kolejnych danych na temat potencjalnych punktów uchwytu działania CLZ i przybliżają do odkrycia bardziej selektywnych neuroleptyków, aczkolwiek nie wyjaśniają w pełni jej unikatowego mechanizmu działania.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Clozapine (CLZ) belongs to the group of second generation (atypical) antipsychotics. It binds several types of central nervous system receptors, and displays a unique pharmacological profile. In contrast to typical neuroleptics, CLZ is not only effective in treating the positive symptoms, but also in negative symptoms and cognitive deficits. Despite the fact that CLZ is used in the clinic, its mechanism of action is not fully understood, and it causes side effects.

G-protein-coupled receptors (GPCRs) are the most important target for antipsychotic drugs, and serotonin receptors have lately become especially important in this context. It has been shown that activation of the 5HT_{1A} receptor i.a. reduces extrapyramidal symptoms caused by typical neuroleptics and improves cognitive deficits induced by NMDA receptor antagonists. In case of 5HT_{2A} receptor, its blockade causes increased release of dopamine in the brain cortex. On the other hand, blockade of dopamine D₂ receptors is crucial in the efficacy of antipsychotic treatment, therefore the regulation of these receptors is also important in the action of atypical neuroleptics. CLZ is a serotonin 5HT_{2A} and dopamine D₂ receptors antagonist and shows agonism at the serotonin 5HT_{1A} receptor, therefore interaction between these receptors – especially in the context of phenomenon of GPCRs heterodimerization, which is extensively described in recent literature – may be involved in the mechanism of CLZ action. A frequently used substance modeling cognitive impairments in animals is ketamine (KET), which is an NMDA receptor antagonist, but also has affinity for the dopamine D₂ and serotonin 5HT_{2A} receptors.

Therefore, this doctoral thesis was aimed to examine the behavioral effects of CLZ and to find changes at the biochemical level that would correlate with the behavioral effects of this drug. In particular, the effect of CLZ on the density and biosynthesis of dopamine D₂ receptors and on the co-localization and heterodimerization of the following pairs of receptor: D₂-5HT_{1A} and 5HT_{1A}-5HT_{2A} were investigated.

To assess the ability of CLZ to improve cognitive deficits, KET-induced cognitive impairments and an Attentional Set Shift Test (ASST) was used. Two doses of CLZ (0.3 and 1 mg/kg) were tested in acute and repeated paradigm of administrations. Results from behavioral experiments showed that lower dose of CLZ (0.3 mg/kg) administered once as well as repeatedly reversed cognitive impairment induced by KET (20 mg/kg), which was observed as the lower number of trials to complete the key phase of the ASST test - extra-dimensional shift (EDS). On the other hand, CLZ administered repeatedly at a dose of 1 mg/kg increased cognitive deficits (Szlachta et al., 2017). Two doses of CLZ were chosen since previous results from *in vitro* studies demonstrated that the effect of CLZ on heterodimerization of GPCR receptors was dependent on drug concentration and incubation time (Faron - Górecka et al., 2008).

Proximity Ligation Assay (PLA) was used to assess the level of interaction between receptors in native tissue. Analysis of the PLA signal showed that drugs administered in acute paradigm did not affect the level of interaction between the studied receptors in the mice prefrontal cortex (PFC) and frontal cortex (Cx). Repeated administration of CLZ (0.3 mg/kg) resulted in an increase in heterodimerization level of both pairs of receptors in the examined brain structures. A higher dose of CLZ (1 mg/kg) did not affect the level of interactions between the studied receptors, while KET increased only the level of 5HT1A-5HT2A heterodimers in the mouse PFC and Cx. Obtained results undoubtedly provide the evidence about the CLZ impact on GPCR heterodimers, but do not explain the effects observed in behavioral experiments.

Due to reports suggesting a possible interaction between NMDA and dopaminergic systems in the aspect of cognitive changes, the influence of CLZ on the dopamine D2 receptors was also examined. For this purpose, an autoradiography analysis with the use of [³H]domperidone – which allows to observe ligand binding sites, and *in situ* hybridization – which allows to examine the level of mRNA encoding dopamine D2 receptor – were used. Analysis of the obtained results suggests that repeated administration of CLZ increases the biosynthesis of pre-synaptic dopamine D2 receptors. An increase in the level of these receptors in the ventral and medial part of the striatum was observed, while in the ventral tegmental area (VTA) an increase in the mRNA expression level of D2 receptor was demonstrated.

The obtained results bring us closer to elucidation of mechanism of CLZ which can contribute to design of more selective neuroleptics although they do not fully explain its unique mechanism of action.