

BADANIA MOLEKULARNYCH MECHANIZMÓW WPLYWU LEKÓW PRZECIWPSYCHOTYCZNYCH
NA DWUWARSTWY LIPIDOWE W ASPEKCIE DZIAŁANIA TYCH LEKÓW NA BŁONY BIOLOGICZNE

Projekt: *Nauki molekularne dla medycyny* (MOL-MED)

mgr Piotr Skrobecki

Pracownia Farmakologii Biochemicznej, Zakład Farmakologii,
Instytut Farmakologii PAN

Promotorzy:

Prof. dr hab. Marta Dziedzicka-Wasylewska

Pracownia Farmakologii Biochemicznej, Zakład Farmakologii,
Instytut Farmakologii PAN

Prof. dr hab. Maria Nowakowska

Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii,
Wydział Chemii UJ

Recenzenci:

Prof. dr hab. Irena Nalepa

Zakład Biochemii Mózgu,
Instytut Farmakologii PAN

Dr hab. Anna Wiśniewska-Becker

Zakład Biofizyki,
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Streszczenie:

Leki przeciwpsychotyczne (neuroleptyki) znajdują szerokie zastosowanie w leczeniu licznych schorzeń psychiatrycznych i neurologicznych. Przyjmuje się, że ich podstawowa aktywność farmakologiczna związana jest z powinowactwem do białkowych receptorów błonowych – przede wszystkim dopaminowych D_2 oraz serotoninowych $5-HT_{2A}$. Jednakże, biorąc pod uwagę szerokie spektrum działania neuroleptyków oraz ich liczne skutki uboczne, teoria receptorowa nie wyjaśnia wszystkich efektów klinicznych. Stwierdzone uprzednio zmiany w składzie i właściwościach fizykochemicznych błon na skutek terapii neuroleptykami, a także lokalizacja białek receptorowych w obrębie dwuwarstwy lipidowej błon stanowiły punkt wyjścia podjęcia badań przedstawionych w prezentowanej Rozprawie.

Prace badawcze skoncentrowano na opisie termodynamicznym oddziaływań neuroleptyk – błona modelowa. Badania wykonano dla trzech neuroleptyków atypowych (drugiej generacji): sulpirydu, amisulpirydu, olanzapiny oraz jednego neuroleptyku typowego (klasycznego): tiorydazyny. Wykorzystano dwa układy modelowe błon: liposomy wykonane z POPC (o ładunku obojętnym) oraz z POPC/POPG w stosunku molowym 3/1 (o wypadkowym ładunku ujemnym). Badania termodynamiczne prowadzono wykorzystując technikę izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego ITC. Przed eksperymentami ITC wykonano następujące prace wstępne: zoptymalizowano analityczną metodę oznaczania fosforu, rozwiązano trudności związane z niską rozpuszczalnością neuroleptyków i wypracowano odpowiednie protokoły przygotowania próbek leków pod kątem planowanych pomiarów.

Studia termodynamiczne prowadzono w dwóch odmiennie zaprojektowanych układach eksperymentalnych. W układzie pierwszym liposomy miareczkowano roztworem badanego leku – miał on na celu wyznaczenie entalpii oddziaływań ΔH . W układzie drugim roztwór leku był miareczkowany liposomami – miał on na celu określenie stałej oddziaływań K , co jest możliwe po zastosowaniu odpowiedniego modelu matematycznego wiążącego rejestrowane w toku miareczkowania zmiany ciepła z zachodzącym procesem wiązania leku do liposomów. Obliczenia wykonano z wykorzystaniem modelu oddziaływań hydrofobowych – poprzez wyznaczenie izoterm wiązania oraz stosując aproksymację iteracyjną. Dodatkowo, podjęto próbę opisu interakcji neuroleptyk – błona modelowa z uwzględnieniem oddziaływań elektrostatycznych w oparciu o model podwójnej warstwy elektrycznej Gouya-Chapmana.

Uzyskane rezultaty wskazują, iż największa entalpia towarzyszy oddziaływaniu olanzapiny, a następnie tiorydazyny, jest ona porównywalna dla obu stosowanych układów modelowych błon. Entalpia zmierzona dla amisulprydu z liposomami POPC/POPG wskazuje na subtelne oddziaływanie. Natomiast eksperymenty dla amisulprydu z POPC oraz sulpirydu dla obu układów modelowych wykazują zbliżoną do zera entalpię oddziaływań. Wyznaczone w oparciu o przybliżenie iteracyjne stałe oddziaływań sugerują, iż największe powinowactwo względem obu układów wykazuje tiorydazyna, następnie olanzapina, zaś na końcu sytuuje się amisulpryd z POPC/POPG. Eksperymenty ITC mające na celu wyznaczenie stałej wykonano jedynie w przypadku tych leków, dla których w pierwszym wariancie eksperymentu stwierdzono odpowiednie efekty cieplne. Ponadto, z przeprowadzonych badań termodynamicznych płynie jasny wniosek, iż fizykochemiczny mechanizm oddziaływania pomiędzy badanymi lekami przeciwpsychotycznymi a stosowanymi dwuwarstwowymi lipidowymi jest złożony i nie mieści się w obszarze proponowanym przez zastosowane modele interpretacyjne.

Stwierdzone różnice w oddziaływaniu pomiędzy poszczególnymi neuroleptykami na podstawie przeprowadzonych studiów termodynamicznych stanowiły asumpt do dalszej eksploracji zagadnienia. Podjęto się oceny wpływu zaobserwowanych oddziaływań na rozmiary stosowanych pęcherzyków lipidowych (pomiar dynamicznego rozpraszania światła DLS), potencjał powierzchniowy (pomiar potencjału Zeta). Zaś w ostatnim etapie, wieńczącym zaprezentowane badania – oceny wpływu na dyfuzję translacyjną sondy fluorescencyjnej di-4-ANEPPDHQ wbudowanej do błon komórkowych linii modelowej HEK293 (badania te wykonano za pomocą jednej z technik mikroskopii fluorescencyjnej: pomiarów odzysku fluorescencji po fotobłaknięciu FRAP). Uzyskane rezultaty wskazują, iż jedynie tiorydazyna wykazuje niewielki wpływ na rozmiar pęcherzyków lipidowych, wykonanych z POPC. Tiorydazyna wywiera także najbardziej znaczny wpływ na potencjał Zeta, dla obu stosowanych modeli błon. Mniejsza zmiana potencjału Zeta obserwowana jest w przypadku olanzapiny. Dla sulpirydu i amisulprydu wpływu na potencjał Zeta nie zaobserwowano. Pomiar FRAP nie wskazuje by traktowanie komórek HEK293 którymkolwiek z badanych neuroleptyków wpływało w istotny sposób na ruchliwość stosowanego znacznika fluorescencyjnego. Jednak, biorąc pod uwagę specyfikę i ograniczenia sondy di-4-ANEPPDHQ, można stwierdzić, iż jednoznaczne rozstrzygnięcie kwestii wpływu na dyfuzję lateralną błon biologicznych wymaga dalszych badań, np. z zastosowaniem bardziej selektywnych sond.

Podsumowując można stwierdzić, iż leki przeciwpsychotyczne z całą pewnością nie są obojętne dla dwuwarstw lipidowych. Spośród przebadanych leków najbardziej wyróżniają się tiorydazyna oraz olanzapina, zarówno w termodynamice oddziaływań, jak i we wpływie na potencjał powierzchniowy stosowanych układów modelowych błon biologicznych (liposomów obojętnych wykonanych z POPC oraz naładowanych ujemnie z POPC/POPG w stosunku molowym 3/1), a także – w przypadku tiorydazyny – we wpływie na rozmiar pęcherzyków lipidowych, wykonanych z POPC. Sulpiryd wydaje się nie oddziaływać z badanymi dwuwarstwami, natomiast w przypadku amisulprydu można domniemywać subtelne oddziaływanie z liposomami POPC/POPG. Dokładny mechanizm wpływu leków przeciwpsychotycznych na błony komórkowe nadal pozostaje pod znakiem zapytania, jednakże wnioski płynące z wykonanej pracy wskazują jasno, iż wątek ten powinien być brany pod uwagę w pracach nad dalszym rozwojem tego typu farmaceutyków, zwłaszcza w aspekcie ich szerokiego profilu działania terapeutycznego.