

mgr Tadeusz Witarski

„Badanie nad udziałem receptorów alfa1-adrenergicznych w zjawisku sensytyzacji kokainowej i jej modulacji przez GABA-mimetyki”

Promotor: **prof. dr hab. Irena Nalepa**

Recenzenci: **prof. dr hab. Jolanta Skangiel-Kramska**
dr hab. Teresa Zalewska, prof. IMDiK PAN

STRESZCZENIE

Pomimo wielu przeprowadzonych badań i znacznego wzrostu wiedzy, do chwili obecnej nie udało się opracować skutecznej farmakoterapii przeciwdziałającej zjawisku uzależnienia od substancji psychostymulujących, takich jak kokaina. Jedną z proponowanych terapii było zastosowanie leków z grupy GABA-mimetyków. Mechanizm działania kokainy polega na hamowaniu transporterów wychwytu zwrotnego dla monoamin, a przez to na nasileniu transmisji dopaminergicznej, serotoninerdycznej i noradrenergicznej. Podczas gdy transmisja dopaminergiczna układu nagrody mózgu jest zaangażowana w fazę nabywania zależności, układ noradrenergiczny wydaje się pełnić szczególne znaczenie w fazie nawrotu do poszukiwania i używania kokainy.

Przesłankami dla hipotezy roboczej, zweryfikowanej w niniejszej pracy doktorskiej, o zaangażowaniu receptorów α_1 -adrenergicznych w zjawisku sensytyzacji na kokainę, były prace pokazujące ich permissywną rolę w behawioralnych efektach stymulacji dopaminowej oraz wyniki badań na zwierzętach pozbawionych receptora α_{1B} -adrenergicznego, które wskazywały na szczególne znaczenie tego podtypu we właściwościach nagradzających substancji psychostymulujących i motywacyjnych do poszukiwania narkotyku

Celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza receptorów α_1 -adrenergicznych (gęstości receptorów, ekspresji mRNA trzech podtypów receptorów i białka receptora α_{1B} -adrenergicznego) u zwierząt z wywołaną sensytyzacją behawioralną na kokainę oraz wpływu związków nasilających transmisję GABA-ergiczną (tiagabiny i wigabatryny) na indukowane kokainą ilościowe zmiany w receptorach α_1 -adrenergicznych.

Zastosowano standardowy model sensytyzacji behawioralnej, którego miarą jest wzrost aktywności motorycznej zwierząt po wielokrotnym podawaniu kokainy w stosunku do efektu wywołanego przez pojedynczą dawkę narkotyku. Sensytyzacja behawioralna modeluje narastające pragnienie pozyskania narkotyku, jakie jest obserwowane w przebiegu procesu uzależnienia. Eksperymenty przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Wistar, poddanych procedurze sensytyzacji: 5 dni podawania kokainy w dawce 10 mg/kg, a następnie po 4 dniowym okresie odstawienia podanie dawki kokainy 10 mg/kg, która w części eksperymentów była poprzedzona podaniem soli fizjologicznej lub tiagabiny (10 mg/kg) albo wigabatryny (150 mg/kg). Po przeprowadzeniu pomiaru aktywności lokomotorycznej pobierano tkanki mózgowe dla badań biochemicznych i molekularnych.

Stwierdzono, że ani wigabatryna ani tiagabina nie zmieniały podstawowej ruchliwości szczurów, natomiast wzrost aktywności lokomotorycznej wywołany pojedynczym podaniem kokainy był hamowany przez jednorazowe, uprzednie podanie tiagabiny lub wigabatryny. Aktywność lokomotoryczna szczurów z wywołaną ekspresją sensytyzacji była osłabiana (o około 50 %)

przez podanie dawki tiagabiny oraz wigabatryny przed dawką kokainy wyzwalającą sensytyzację.

Ilościowe rozmieszczenie receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych w mózgu szczurów poddanych sensytyzacji kokainowej oceniano metodą autoradiograficznej analizy miejsc wiązania [3H]prazosyny. Badania wykonano w dwóch różnych układach eksperymentalnych, z których pierwszy obejmował analizę efektów po 2 i 48 godz. od ostatniej, wyzwalającej sensytyzację, iniekcji kokainy w porównaniu do jednorazowego podania kokainy (zwierzętom które otrzymywały wcześniej jedynie sól fizjologiczną). Stwierdzono, że kokaina zmienia gęstość receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych w strukturach szczególnie istotnych w zjawisku uzależnienia od związków psychostymulujących takich jak jądro półleżące przegrody i jądra migdałowe oraz wzgórze, a także że sensytyzacja wpływa na odpowiedź receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych na kokainę, podwyższając ilość receptorów w większości badanych rejonów mózgu, za wyjątkiem jąder wzgórza gdzie obserwowano obniżenie ich gęstości. Zmiany w gęstości receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych były różnie zaznaczone u zwierząt sensytyzowanych kokainą i niesensytyzowanych, a te różnice były widoczne zwłaszcza po 48 godz. okresie odstawienia od podania dawki kokainy wyzwalającej sensytyzację.

W drugim układzie eksperymentalnym, analizę autoradiograficzną receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych wykonywano po 24 godz. od ostatniego podania kokainy (lub soli fizjologicznej), różnicowano receptor $\alpha 1B$ -adrenergiczny oraz badano wpływ podania GABA-mimetyków na ilościowe zmiany receptorów wywoływane sensytyzacją kokainową.

Podanie samej wigabatryny podwyższało gęstość receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych w strukturach, w których tiagabina wywołała obniżenie gęstości (jądro półleżące, jądra migdałowe BLA + LaDL), a w hipokampie nie wywołało zmian. Obydwa GABA-mimetyki (wigabatryna i tiagabina) powodowały spadek w podwzgórzu i korze motorycznej (M1).

W strukturach mózgu, w których kokaina nie indukowała zmian (w jądrach migdałowych, CEM + CL, i wzgórzu, MHB), podanie pojedynczej dawki tiagabiny przed kokainą powodowało obniżenie gęstości receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych. W hipokampie, gdzie podanie pojedynczej dawki kokainy podwyższyło gęstość receptorów uprzednie podanie tiagabiny spowodowało zahamowanie efektu kokainy. W jądrze półleżącym i wzgórzu, gdzie pojedyncze podanie kokainy wywołało wzrost gęstości $\alpha 1B$, wcześniejsze podanie dawki tiagabiny przeciwdziało lub odwracało ten efekt. Podobnie, podanie wigabatryny przed dawką kokainy (wywołującą wzrost gęstości receptora $\alpha 1B$) osłabiło efekt kokainy w jądrze półleżącym, przegrody.

W jądrach migdałowych, wzgórzu i hipokampie, w których sensytyzacja kokainowa wywołała obniżenie gęstości całkowitej puli receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych, wcześniejsze podanie tiagabiny przeciwdziało lub odwracało efekty podania kokainy. W strukturach, w których sensytyzacja nie spowodowała zmian gęstości receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych (jądro półleżące przegrody) lub podnosiła poziom gęstości całkowitej puli tych receptorów (obszary korowe), podanie tiagabiny wywołało jej obniżenie.

W obszarach korowych, zmiany w ilości receptorów wywołane przez dawkę kokainy wyzwalającą sensytyzację były hamowane przez uprzednie podanie zarówno tiagabiny jak i wigabatryny. Podobnie w podwzgórzu zarówno wigabatryna jak i tiagabina obniżały gęstość receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych u szczurów sensytyzowanych. Pomimo że wigabatryna okazała się w tym przypadku bardziej efektywna, to jednak w innych strukturach mózgu nie wpływała na efekty wywołane przez kokainę.

W przypadku receptora podtypu $\alpha 1B$ -adrenergicznego, tiagabina podana przed dawką kokainy u szczurów sensytyzowanych powodowała obniżenie gęstości receptora, w strukturach, w których podanie kokainy było bez wpływu, takich jak jądra migdałowe, podwzgórze i hipokamp,

natomiast zaobserwowano odwrócenie efektu kokainy w rejonie wzgórza (MHB). Wigabatryna przeciwdziałała wywołanemu kokainą obniżeniu gęstości receptora w jądrze półleżącym przegrody i jego podwyższeniu w obszarze kory zakrętu obręczy, natomiast w obszarze kory motorycznej pierwszorzędowej wywołała wzrost gęstości tego receptora.

W następnym etapie pracy analizowano (metodą real-time PCR) wpływ sensytyzacji kokainowej na ekspresję mRNA trzech podtypów receptora $\alpha 1$ -adrenergicznego w wybranych strukturach mózgu, w których u zwierząt sensytyzowanych, zaobserwowano obniżenie gęstości receptorów po analizie autoradiograficznej. W większości badanych struktur zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA podtypów receptora $\alpha 1$ -adrenergicznego po pojedynczym podaniu kokainy i także w grupie sensytyzowanej w okresie odstawienia za wyjątkiem wzgórza, gdzie nie obserwowano zmian dla żadnego podtypu. Podanie kokainy zwierzętom zarówno nie-sensytyzowanym jak i sensytyzowanym wywołało w jądrze półleżącym przegrody obniżenie $\alpha 1D$ mRNA i podobny efekt obserwowano w odstawieniu od kokainy. Podanie zwierzętom sensytyzowanym tiagabiny (ale nie wigabatryny) przed dawką kokainy wyzwalającą sensytyzację (behawioralną) zapobiegało efektowi kokainy i ekspresja $\alpha 1D$ wracała do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych.

Analizując poziom białka receptora $\alpha 1B$ -adrenergicznego (metodą Western blotting) stwierdzono, że ekspresja sensytyzacji wywołuje wzrost białka receptora $\alpha 1B$ we wzgórzu i obydwie GABA-mimetyki przeciwdziałały efektowi kokainy. W podwzgórzu, wywołany kokainą wzrost poziomu białka receptora $\alpha 1B$ był hamowany tylko przez podanie tiagabiny, podczas gdy wigabatryna, która sama również podnosiła poziom tego białka, nie odwracała efektów wywołanych podaniem kokainy.

W niniejszej pracy zbadano ponadto wpływ tiagabiny i wigabatryny, podawanych zwierzętom oddzielnie lub łącznie z kokainą, na reaktywność korowych receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych *in vitro*, której wykładnikiem była akumulacja trifosforanu inozytolu w odpowiedzi na stymulację noradrenaliną. Podanie tiagabiny lub wigabatryny nie powodowało zmian w odpowiedzi fosforanów inozytolu w porównaniu do kontroli solnej. Wywołane kokainą nasilenie odpowiedzi receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych na noradrenalinę zostało zahamowane przez podanie tiagabiny, ale nie przez wigabatrynę.

Podsumowując, receptory $\alpha 1$ -adrenergiczne są zaangażowane w działaniu kokainy, a ich poszczególne podtypy mogą w sposób zróżnicowany odpowiadać na sensytyzację kokainową. Nasilenie transmisji GABA-ergicznej przez tiagabinę i wigabatrynę, wywołuje w niektórych rejonach mózgu podobne zmiany w receptorach $\alpha 1$ -adrenergicznych u zwierząt nie-sensytyzowanych i sensytyzowanych, ale w innych strukturach mózgu efekty obu leków mogą różnić się zasadniczo. Ponadto, w niektórych rejonach mózgu sensytyzacja na kokainę powoduje odmienne zmiany w receptorze $\alpha 1B$ w stosunku do całej puli receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych, co sugeruje, że poszczególne podtypy tych receptorów mogą być w różnym stopniu zaangażowane w mechanizmie działania kokainy. Kokaina jest zdolna do nasilania reaktywności receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych, a jej wpływ może być hamowany poprzez nasilenie transmisji GABA-ergicznej. Nasilenie synaptycznego poziomu GABA przez tiagabinę wydaje się być bardziej efektywne w modulowaniu wywołanych przez kokainę zmian w receptorach $\alpha 1$ -adrenergicznych.