



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

mgr Katarzyna Chorążka

**Analiza funkcjonalnego zróżnicowania
podtypów receptorów alfa1-adrenergicznych
w efektach leków przeciwdepresyjnych:
badania w genetycznych modelach
*in vitro i in vivo***

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Mózgu
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

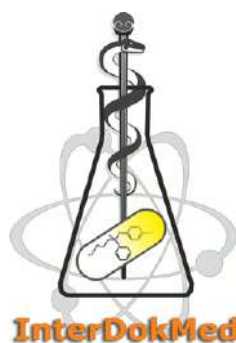
Promotor: prof. dr hab. n. med. Irena Nalepa
Promotor: prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski

Kraków, 2022

Badania przedstawione w niniejszej pracy przeprowadzono w ramach projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt.: „Różnicowanie udziału trzech podtypów receptora alfa(1)-adrenergicznego w efektach leków przeciwdepresyjnych: badania w oparciu o genetyczne modele *in vitro* oraz *in vivo*” (OPUS 9 nr 2015/17/B/NZ7/03018, kierownik: prof. dr hab. Irena Nalepa)



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I



Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji Środowiskowych Studiów
Doktoranckich w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16,
„Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed, realizowanych
w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020,
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



**Fundusze
Europejskie**
Wiedza Edukacja Rozwój

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Składam serdeczne podziękowania Pani **prof. dr hab. Irenie Nalepie**
za opiekę naukową, życzliwość i wyrozumiałość
oraz Panu **prof. dr hab. Wojciechowi Piekoszewskiemu**
za opiekę naukową i możliwość przeprowadzenia badań spektrometrycznych.

Dziękuję **prof. dr hab. Władysławie Daniel i dr Annie Haduch**
za możliwość przeprowadzenia badań chromatograficznych.

Serdecznie dziękuję **Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biochemii Mózgu**
za przekazaną wiedzę, pomoc w realizacji badań i niezwykle przyjazną atmosferę.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam **Rodzinie i Przyjaciółom**
za nieustanne wsparcie i niegasnącą wiarę w moje możliwości.

Spis treści

Wykaz skrótów	8
Streszczenie	11
Abstract	13
1 Wstęp	15
1.1 Receptory α_1 -adrenergiczne	15
1.1.1 Budowa i główne szlaki sygnałowe	18
1.1.2 Regulacja ekspresji i funkcji	20
1.1.3 Rola w układzie sercowo-naczyniowym i moczowo- -płciowym	21
1.1.4 Rola w ośrodkowym układzie nerwowym	23
1.2 Leki przeciwdepresyjne	25
1.2.1 Podział i mechanizmy działania	27
1.2.2 Rola pierwiastków w farmakoterapii depresji	31
1.2.3 Zmiany adaptacyjne w wyniku wielokrotnego stosowania	33
1.2.4 Kierunki poszukiwań nowych strategii farmakologicznych	35
2 Cele pracy	40
3 Materiały i metody	42
3.1 Modele <i>in vitro</i> - linie komórkowe	42
3.1.1 Hodowle komórkowe i transfekcja	42
3.1.2 Ocena aktywacji α_1 -AR na podstawie pomiaru akumulacji wtórnych przekaźników	44

3.1.3	Ocena aktywności metabolicznej komórek - metoda redukcji resazury	45
3.1.4	Badanie gęstości podtypów α_1 -AR na powierzchni komórek - analiza saturacyjna wiązania [3 H]-prazosyny	46
3.1.5	Ocena wpływu leków przeciwdepresyjnych na aktywację podtypów α_1 -AR wywołaną obecnością agonisty	47
3.1.6	Ocena wpływu 24 h i 120 h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi na aktywację podtypów α_1 -AR wywołaną obecnością agonisty	48
3.1.7	Analiza danych	48
3.2	Modele <i>in vivo</i> - mysie linie transgeniczne	50
3.2.1	Hodowla zwierząt i genotypowanie	50
3.2.2	Badanie gęstości receptorów α_1 -AR, α_2 -AR i β -AR w mózgu metodą autoradiografii	54
3.2.3	Oznaczenie poziomów wybranych neuroprzekazników i ich metabolitów metodą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej	56
3.2.4	Oznaczenie ekspresji białek apoptotycznych - macierze białkowe	57
3.2.5	Podawanie leków przeciwdepresyjnych	58
3.2.6	Oznaczenie ekspresji mRNA metodą qRT-PCR	59
3.2.7	Profilowanie ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA	62
3.2.8	Oznaczenie ekspresji białek metodą Western Blot	62
3.2.9	Oznaczenie poziomu pierwiastków metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej	64
3.2.10	Analiza danych	65
4	Wyniki	66
4.1	Modele <i>in vitro</i> - weryfikacja i charakterystyka	66
4.1.1	Ocena funkcjonalności linii komórkowych ze stabilną ekspresją α_{1A} -AR i α_{1B} -AR	67
4.1.2	Badanie gęstości podtypów α_1 -AR na powierzchni komórek	69

4.2	Modele <i>in vitro</i> - efekty leków przeciwdepresyjnych	71
4.2.1	Ocena wpływu leków przeciwdepresyjnych na aktywację podtypów α_1 -AR	71
4.2.2	Ocena wpływu 24 h i 120 h inkubacji z lekami przeciwdepresyjnymi na aktywację podtypów α_1 -AR	75
4.3	Modele <i>in vivo</i> - weryfikacja i charakterystyka	81
4.3.1	Ocena efektywności mutacji linii transgenicznej ABD-KO	82
4.3.2	Wpływ delecji podtypów α_1 -AR na poziomy wybranych neuroprzekaźników i ich metabolitów	86
4.3.3	Ocena wpływu delecji podtypów α_1 -AR na ekspresję białek apoptotycznych	88
4.4	Modele <i>in vivo</i> - efekty leków przeciwdepresyjnych	91
4.4.1	Wpływ delecji podtypów α_1 -AR i leków przeciwdepresyjnych na poziom mRNA pozostałych podtypów α_1 -AR	91
4.4.2	Ocena wpływu delecji podtypów α_1 -AR i leków przeciwdepresyjnych na profil ekspresji genów	94
4.4.3	Ocena wpływu delecji podtypów α_1 -AR i leków przeciwdepresyjnych na ekspresję wybranych białek sygnałowych	99
4.4.4	Wpływ delecji podtypów α_1 -AR i leków przeciwdepresyjnych na poziomy wybranych pierwiastków	107
5	Dyskusja i wnioski	111
5.1	Modele <i>in vitro</i> - weryfikacja i charakterystyka	112
5.2	Modele <i>in vitro</i> - efekty leków przeciwdepresyjnych	114
5.3	Modele <i>in vivo</i> - weryfikacja i charakterystyka	118
5.4	Modele <i>in vivo</i> - efekty leków przeciwdepresyjnych	120
5.5	Wnioski końcowe	126
	Piśmiennictwo	127
	Spis rycin	155
	Spis tabel	157

Wykaz skrótów

5-HIAA kwas 5-hydroksyindolooctowy

5-HT serotonina

[³H]-prazosyna prazosyna znakowana radioizotopem wodoru (trytem)

A-KO mysia linia transgeniczna typu knockout z unieczynnieniem α_{1A} -AR

Akt kinaza białkowa B (ang. *protein kinase B*)

AR receptory adrenergiczne

B-KO mysia linia transgeniczna typu knockout z unieczynnieniem α_{1B} -AR

CAM model genetyczny charakteryzujący się konstytutywną nadekspresją określonego genu (ang. *constitutively active mutant*)

CIT citalopram

D-KO mysia linia transgeniczna typu knockout z unieczynnieniem α_{1D} -AR

DA dopamina

DAG 1,2-diacyloglicerol

DMI dezipramina

DOPAC kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy

ERK kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (ang. *extracellular signal-regulated kinase*)

FAAS płomieniowa absorpcyjna spektrometria atomowa (ang. *flame atomic absorption spectroscopy*)

FLU fluoksetyna

GSK-3 β kinaza syntazy glikogenu 3 β (ang. *glycogen synthase kinase 3 β*)

HIP hipokamp

HVA kwas homowanilinowy

HY podwzgórze

IMAO inhibitory monoaminooksydaz

IMI imipramina

IP fosforan inozytolu

IP₃ inozytolo-1,4,5-trifosforan

KO model genetyczny charakteryzujący się unieczynnieniem określonego genu (ang. *knockout*)

linia α 1A-AR komórki PC12 ze stabilną ekspresją α_{1A} -AR

linia α 1B-AR komórki PC12 ze stabilną ekspresją α_{1B} -AR

linia α 1D-AR komórki ChemiSCREENTM Ready-to-AssayTM α_{1D} Adrenergic Family Receptor Frozen Cells

LPD leki przeciwdepresyjne

MIA mianseryna

MIL milnacipran

NA noradrenalina

NDRIs selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego noradrenaliny i dopaminy (ang. *norepinephrine–dopamine reuptake inhibitors*)

- NRI**s selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny (ang. *norepinephrine reuptake inhibitors*)
- oś HPA** oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*)
- PFC** kora przedczołowa
- PIP₂** fosfatydyloinozytylo-4,5-bisfosforan
- PKC** kinaza białkowa C
- PLC β** fosfolipaza C β
- REB** reboksetyna
- sal** sól fizjologiczna
- SARIs** antagoniści receptorów serotoninowych i inhibitory wychwyty zwrotnego 5-HT (ang. *serotonin antagonists and reuptake inhibitors*)
- SNRI**s selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny i serotoniny (ang. *serotonin–norepinephrine reuptake inhibitors*)
- SOD** dysmutaza ponadtlenkowa
- SSRI**s selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny (ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*)
- TeCAs** tetracykliczne leki przeciwdepresyjne (ang. *tetracyclic antidepressants*)
- TH** wzgórze
- TLPD** trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne
- TRD** depresja oporna na leczenie (ang. *treatment-resistant depression*)
- UHPLC** ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *ultra-high performance liquid chromatography*)
- WT** typ dziki (ang. *wild type*)

Streszczenie

Noradrenalina mediuje odpowiedź organizmu na sytuacje stresowe poprzez oddziaływanie z receptorami adrenergicznymi w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Spośród nich wyróżnia się rodzinę receptorów α_1 -adrenergicznych (α_1 -AR), która składa się z trzech podtypów: α_{1A} , α_{1B} i α_{1D} . Ich zróżnicowana dystrybucja i funkcje zostały stosunkowo dobrze scharakteryzowane w obwodowym układzie nerwowym, jednak w mózgu badanie podtypów α_1 -AR jest utrudnione lub często niemożliwe ze względu na brak wysoce selektywnych ligandów zdolnych do przekraczania bariery krew-mózg oraz wysoce specyficznych przeciwciał. Mimo tych ograniczeń, istnieją doniesienia wskazujące na zróżnicowane zaangażowanie podtypów α_1 -AR w etiologię, patofizjologię i farmakoterapię zaburzeń psychicznych - w tym depresję. Historia farmakoterapii tej choroby jest stosunkowo krótka, jednak od samego jej początku leki przeciwdepresyjne (LPD) wpływały w sposób bezpośredni lub pośredni na układ noradrenergiczny. Niestety w kontekście specyficznych funkcji regulowanych przez podtypy α_1 -AR efekty te nadal pozostają w dużej mierze niewyjaśnione, dlatego zdefiniowanie funkcjonalnego zróżnicowania podtypów α_1 -AR w efektach działania LPD wydaje się być kluczowe do zwiększenia skuteczności, szybkości i bezpieczeństwa farmakoterapii depresji.

Głównym celem niniejszej rozprawy było zbadanie, czy udział i funkcjonalność α_1 -AR w efektach LPD są zróżnicowane w zależności od podtypu α_1 -AR, na podstawie badań przeprowadzonych w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo*. Badania *in vitro* wykonano z wykorzystaniem trzech linii komórkowych ze stabilną ekspresją pojedynczego podtypu α_1 -AR w celu określenia czy i jak LPD z różnych grup działają na aktywację poszczególnych podtypów α_1 -AR wywołaną obecnością agonisty, z uwzględnieniem ich krótkotrwałego i długotrwałego oddziaływania

na α_1 -AR. Z kolei badania *in vivo* wykonano z wykorzystaniem trzech mysich linii transgenicznych typu knockout z selektywnym unieczynnieniem genu kodującego pojedynczy podtyp α_1 -AR w celu określenia czy i jak dana mutacja wpływa na efekty długotrwałego stosowania LPD z różnych grup, na różnych poziomach molekularnych w mózgu samców i samic.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, że LPD działające antagonistycznie względem α_1 -AR wykazują najsłabszy efekt na podtyp α_{1B} i uzupełniono tę wiedzę o kolejne związki - dezipraminę i citalopram. Przeprowadzone badania *in vitro* dostarczyły również nowych danych w kontekście długotrwałego oddziaływania LPD na α_1 -AR wskazując, że prowadzi ono do wyraźnego nasilenia przekazu sygnału noradrenergicznego za pośrednictwem podtypu α_{1B} w wyniku działania imipraminy lub dezipraminy oraz za pośrednictwem α_{1A} i α_{1B} w wyniku działania citalopramu, na skutek zwiększenia ich reaktywności na noradrenalinę. Co ciekawe, w bezpośrednim działaniu na α_1 -AR leki te wykazywały najsilniejszy efekt antagonistyczny względem podtypu α_{1D} , co koreluje z wynikami uzyskanymi w modelach *in vivo*. W badaniach tych wykazano bowiem na różnych poziomach molekularnych, że unieczynnienie podtypu α_{1D} u myszy moduluje efekty długotrwałego stosowania dezipraminy lub milnacipranu, w sposób zależny od płci. Ponadto, może to być związane z kompensacją funkcji podtypu α_{1D} przez podtyp α_{1A} . Różnice międzypłciowe odnotowano również w poziomie pierwiastków w mózgu, jednak w tym przypadku efekty działania badanych LPD nie były zależne od podtypów α_1 -AR.

Podsumowując, funkcjonalne zróżnicowanie podtypów α_1 -AR w efektach LPD wykazano zarówno w genetycznych modelach *in vitro*, jak i w modelach *in vivo*. Wyniki niniejszej rozprawy pozwoliły na bardziej precyzyjne zdefiniowanie funkcji wszystkich trzech podtypów α_1 -AR w efektach krótkotrwałego i długotrwałego stosowania klinicznie istotnych LPD oraz wyznaczyły liczne ścieżki, których zbadanie może przyczynić się do rozwoju nowych strategii farmakologicznych leczenia depresji.

Abstract

Norepinephrine mediates the body's response to stressful situations by interacting with adrenergic receptors in the central and peripheral nervous systems. Among them, there is a family of α_1 -adrenergic receptors (α_1 -AR), which consists of three subtypes: α_{1A} , α_{1B} and α_{1D} . Their diverse distribution and functions have been relatively well characterized in the peripheral nervous system, however, in the brain, the study of the α_1 -AR subtypes is difficult or often impossible due to the lack of highly selective ligands capable of crossing the blood-brain barrier and the lack of highly specific antibodies. Despite these limitations, there are reports indicating the diversified involvement of the α_1 -AR subtypes in the etiology, pathophysiology and pharmacotherapy of mental disorders - including depression. The history of pharmacotherapy of depression is relatively short, but from the very beginning, antidepressant drugs (AD) had a direct or indirect effect on the noradrenergic system. Unfortunately, in the context of the specific functions regulated by the α_1 -AR subtypes, these effects still remain largely unexplained. Therefore, defining the functional differentiation of the α_1 -AR subtypes in the effects of AD seems to be crucial to increasing the effectiveness, speed and safety of pharmacotherapy of depression.

The main aim of this dissertation was to investigate whether the contribution and functionality of α_1 -AR in the effects of AD varies depending on the α_1 -AR subtype, based on research carried out in the *in vitro* and *in vivo* genetic models. The *in vitro* studies were performed with the use of three cell lines stably expressing a single α_1 -AR subtype to determine if and how AD from different groups act on agonist-induced activation of each α_1 -AR subtype, with taking into account their short-term and long-term effects. On the other hand, the *in vivo* studies were performed with the use of three mouse transgenic knockouts with selective inactivation of

the gene encoding a single α_1 -AR subtype in order to determine whether and how a given mutation affects the effects of long-term use of AD from various groups, at different molecular levels in the male and female brain.

The obtained results confirmed that AD that act antagonistically towards α_1 -AR show the weakest effect on the α_{1B} subtype and supplemented this knowledge with other compounds - desipramine and citalopram. Also, the *in vitro* studies provided new data in the context of the long-term effect of AD on α_1 -AR, indicating that it leads to a marked increase in noradrenergic signal transmission via the α_{1B} subtype as a result of the action of imipramine or desipramine and via α_{1A} and α_{1B} as a result of the action of citalopram, by increasing their reactivity to norepinephrine. Interestingly, in direct action on α_1 -AR, these drugs showed the strongest antagonistic effect against the α_{1D} subtype, which correlates with the results obtained in *in vivo* models. In turn, these studies have shown at various molecular levels that inactivation of the α_{1D} subtype in mice modulates the effects of long-term use of desipramine or milnacipran in a gender-dependent manner. Also, it may be related to the α_{1D} subtype function compensation by the α_{1A} subtype. Gender differences were also noted in the level of elements in the brain, but in this case the effects of the tested AD were not dependent on the α_1 -AR subtypes.

In summary, functional differentiation of the α_1 -AR subtypes in AD effects was demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* genetic models. The results of this dissertation provided more precise definition of the function of all three α_1 -AR subtypes in the effects of short-term and long-term use of clinically significant AD, and indicated numerous pathways, the study of which may contribute to the development of new pharmacological strategies for the treatment of depression.

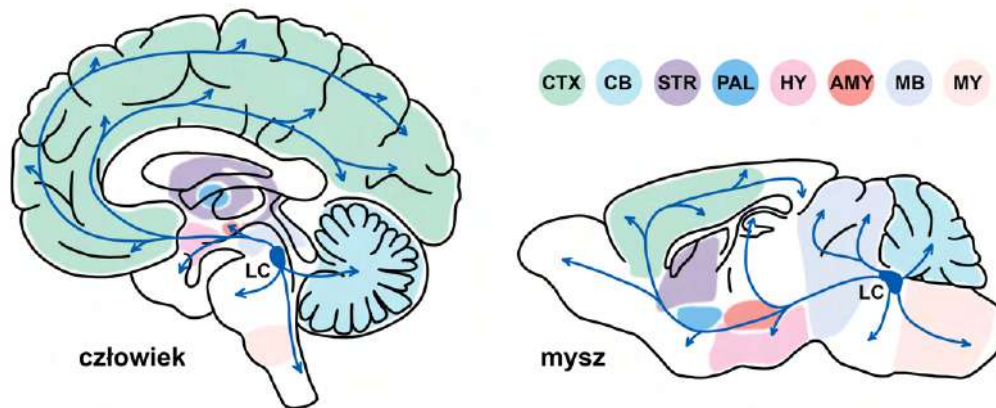
Rozdział 1

Wstęp

1.1 Receptory α_1 -adrenergiczne

Adrenalina i noradrenalina (NA) należą do grupy katecholamin, pełniących w układzie nerwowym dwojaką funkcję. W części obwodowej układu nerwowego są syntetyzowane w rdzeniu nadnerczy i po uwolnieniu do krwiobiegu działają jako hormony. Z kolei w ośrodkowym układzie nerwowym pełnią funkcję neuroprzekaźników, a ich synteza zachodzi w neuronach, których ciała komórkowe zlokalizowane są w tyłomózgowiu – moście i rdzeniu przedłużonym. Zdecydowana większość neuronów noradrenergicznych znajduje się w grzbietowej części mostu, w obszarze zwanym miejscem sinawym (LC, łac. *locus coeruleus*), skąd wysyłają projekcje do struktur układu limbicznego, kory mózgowej, mózdzku i rdzenia kręgowego [Breton-Provencher et al., 2021] (Rycina 1.1).

W ten sposób, dzięki podwójnej roli i działaniu zarówno jako hormony jak i neuroprzekaźniki, adrenalina i NA pośredniczą w mobilizacji organizmu do działania w odpowiedzi na bodźce z otoczenia oraz w utrzymaniu wewnętrznej homeostazy w sytuacjach zaburzających fizjologiczną równowagę organizmu. W wyniku ich działania dochodzi do zmian obserwowanych w całym ciele, m.in. do wzrostu częstości akcji serca, ciśnienia tętniczego krwi, poziomu glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych we krwi, rozszerzenia źrenic i zwężenia naczyń krwionośnych płuc, mózgu, mięśni szkieletowych, skóry i błon śluzowych, a także zwiększenia pobudzenia, czujności, uwagi i koncentracji [Feldman et al., 1997]. Efekty te jednak nie mogłyby być osiągnięte bez pośrednictwa receptorów adrenergicz-



Rycina 1.1: Schemat układu noradrenergicznego w mózgu człowieka i myszy (na podstawie Breton-Provencher et al., 2021). Na rycinie zaznaczono noradrenergiczne połączenia eferentne z miejsca sinawego (LC) do kory mózgowej (CTX), mózdzku (CB), prążkowiec (STR), gałki bladej (PAL), podwzgórze (HY), zespołu jąder migdałowych (AMY), śródmózgowia (MB) i rdzenia przedłużonego (MY).

nych (AR). Ich dystrybucja w organizmie jest równie szeroka jak zasięg działania wspomnianych katecholamin, gdyż znajdują się zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i niemal we wszystkich tkankach obwodowych.

Globalny i zróżnicowany w zależności od rodzaju badanej tkanki charakter działania NA i adrenaliny skłonił badaczy do poszukiwania źródła tych cech na poziomie receptorowym. W 1948 roku Raymond Ahlquist zaproponował przełomową na ten czas koncepcję, która głosiła istnienie dwóch różnych typów AR, α i β , wykazujących odmienne efekty aktywacji w wyniku działania tego samego liganda [Ahlquist, 1948]. Kolejne lata badań z wykorzystaniem bardziej selektywnych agonistów i antagonistów pozwoliły na bardziej szczegółowe rozróżnienie AR pod względem ich właściwości farmakologicznych [Berthelsen and Pettinger, 1977, Wikberg, 1978, Starke, 1981]. Ostatecznie, w 1995 roku Międzynarodowa Unia Farmakologii (IUPHAR, ang. *The International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) zatwierdziła podział AR na trzy rodziny, α_1 , α_2 i β , z których każda obejmuje trzy podtypy receptorów [Hieble, 1995, Harding et al., 2018, Sharman et al., 2018] (Tabela 1.1).

Rodzina α_1 -AR składa się z trzech podtypów oznaczonych jako α_{1A} , α_{1B} i α_{1D} . Początkowo wyróżniono podtypy α_{1A} i α_{1B} na podstawie różnic właściwości farmakologicznych zaobserwowanych w testach kompetycyjnego wypierania radioliganda, [^3H]-prazosyny (antagonisty α_1 -AR), z kompleksu z receptorem. Badania te

Tabela 1.1: Podział receptorów adrenergicznych z wyszczególnieniem głównych szlaków sygnałowych.

Rodzina	Podtypy	Białko G	Główne efekty aktywacji
α_1 -AR	α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}	$G_{q/11}$	+PLC β , $\uparrow$ DAG, +PKC, $\uparrow$ IP $_3$, $\uparrow$ Ca $^{2+}$
α_2 -AR	α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}	G_i	-AC, $\downarrow$ cAMP, -PKA
β -AR	β_1 , β_2 , β_3	G_s	+AC, $\uparrow$ cAMP, +PKA

wykazały wielokrotnie wyższe powinowactwo wiązania WB4101 (antagonisty α_1 -AR) i fentolaminy (nieselektywnego antagonisty α_1 -AR i α_2 -AR) przez α_{1A} -AR w porównaniu do α_{1B} -AR [Morrow and Creese, 1986]. Następnie, dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej, sklonowano podtyp α_{1B} z mięśni gładkich chomika [Cotecchia et al., 1988], podtyp α_{1A} z mózgu woła [Schwinn et al., 1990], który pierwotnie określono jako α_{1C} , oraz odkryto i sklonowano podtyp α_{1D} z mózgu szczura [Lomasney et al., 1991, Perez et al., 1991], który pierwotnie określono jako α_{1A} [Hieble, 1995]. Sugerowano również istnienie podtypu α_{1L} charakteryzującego się stosunkowo niskim powinowactwem wiązania prazosyny, jednak najnowsze doniesienia wskazują, że jest to jedynie stan konformacyjny podtypu α_{1A} aniżeli odrębny podtyp α_1 -AR [Docherty, 2010, White et al., 2019].

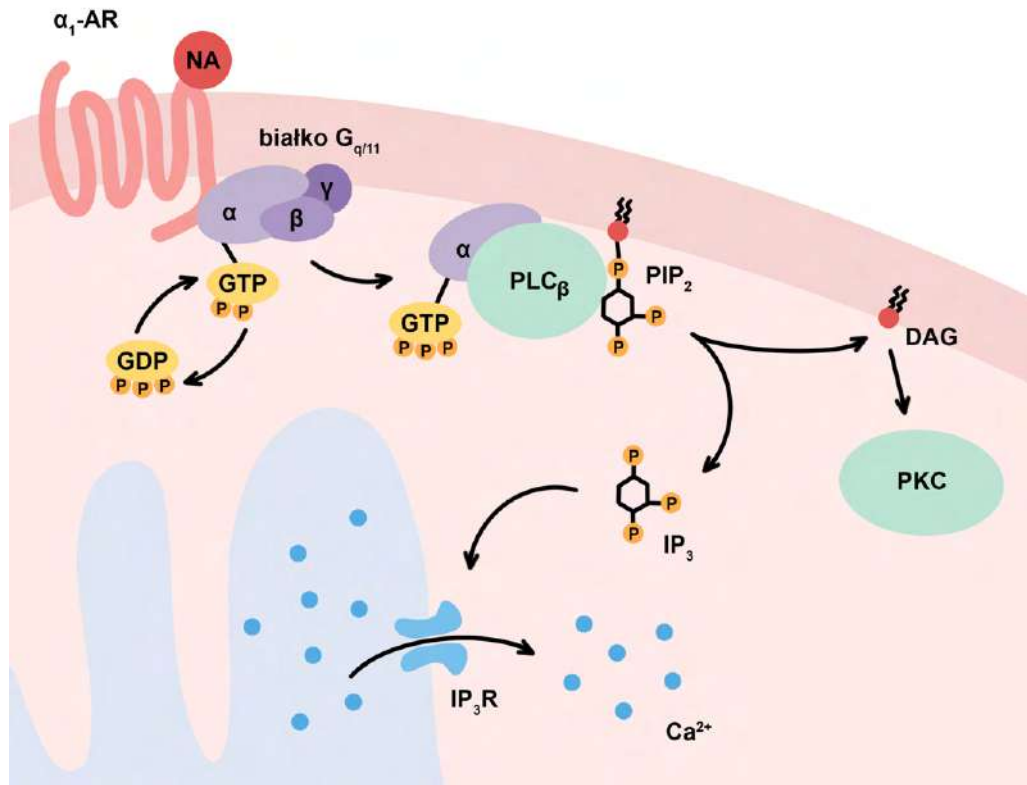
Mimo, że badania podtypów α_1 -AR prowadzone są już od ponad trzech dekad, specyficzne funkcje regulowane przez poszczególne podtypy są nadal w dużej mierze niewyjaśnione. Wynika to przede wszystkim z ograniczeń metod, technik i narzędzi badawczych, które napotymano w kolejnych latach badań. Przykładowo, w toku pierwszych badań mających na celu określenie właściwości farmakologicznych poszczególnych podtypów α_1 -AR wykorzystano bardzo szeroki zakres związków chemicznych. Wyniki tych badań są jednak niejednokrotnie niespójne, a czasem nawet sprzeczne. Powodem tego jest bardzo niska selektywność niektórych z zastosowanych ligandów, np. fentolaminy, która jak obecnie wiadomo wykazuje działanie antagonistyczne zarówno do α_1 -AR jak i α_2 -AR. Niestety do tej pory nie ma komercyjnie dostępnych ligandów o tak wysokiej selektywności by można było z należytą dokładnością rozróżnić podtypy α_1 -AR [Perez, 2020]. Ponadto, wiele badań zostało przeprowadzonych jeszcze przed opracowaniem technik kło-

nowania molekularnego, a w ostatnich latach to właśnie dzięki wykorzystaniu modeli zwierzęcych otrzymanych na drodze inżynierii genetycznej wiedza na temat udziału podtypów α_1 -AR w reakcjach fizjologicznych i patologicznych została w znacznym stopniu poszerzona.

1.1.1 Budowa i główne szlaki sygnałowe

α_1 -AR, jak wszystkie AR, należą do nadrodziny receptorów metabotropowych. Zatem składają się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego (w tym przypadku o długości 446-572 reszt aminokwasowych), który 7-krotnie przechodzi przez błonę komórkową tak, że jego N-koniec zlokalizowany jest zewnątrzkomórkowo, a C-koniec wewnątrzkomórkowo. α_1 -AR charakteryzują się długim C-końcem (137-179 reszt aminokwasowych), który odgrywa istotną rolę w regulacji receptora i krótką trzecią pętlą wewnątrzkomórkową (68-73 reszt aminokwasowych) [Lennarz and Lane, 2013]. Pętla ta jest ważna w kontekście sprzężenia receptora z białkiem $G_{q/11}$, które aktywowane w wyniku związania agonisty do receptora oddziałuje z fosfolipazą $C\beta$ ($PLC\beta$), tym samym zapoczątkowując wzmocnienie przekazywanego sygnału poprzez uruchomienie kaskady fosfoinozytoliowej. $PLC\beta$ katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytylo-4,5-bisfosforanu (PIP_2) do przekaźników drugiego rzędu, 1,2-diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP_3). DAG pozostaje związany w dwuwarstwie lipidowej i bierze udział w aktywacji kinazy białkowej C (PKC), co finalnie prowadzi do zwiększenia mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów wapnia. Natomiast IP_3 dyfunduje w cytoplazmie i wiąże się z receptorem błonowym retikulum endoplazmatycznego, w wyniku czego dochodzi do gwałtownego napływu jonów wapnia do cytoplazmy [Purves et al., 2004, Nalepa and Vetulani, 2004] (Rycina 1.2).

Choć wszystkie trzy podtypy α_1 -AR aktywują ten sam główny szlak sygnałowy, profile zmian ekspresji genów wywoływanych w komórce za ich pośrednictwem nie zawsze są takie same. Podtypy te wykazują różnice pod względem rozmieszczenia w tkankach i komórkach oraz pod względem sekwencji aminokwasowej – są nawet kodowane przez różne geny zlokalizowane na różnych chromosomach [Hirasawa et al., 1997, Nalepa et al., 2013, Akinaga et al., 2019]. Różnice między poszczególnymi podtypami α_1 -AR są obserwowane także na poziomie ich regulacji.



Rycina 1.2: Główny szlak sygnałowy aktywowany za pośrednictwem receptorów α_1 -adrenergicznych (α_1 -AR). Oddziaływanie cząsteczki noradrenaliny (NA) z α_1 -AR powoduje związanie podjednostki α trimerycznego białka $G_{q/11}$ i jego aktywację, czego efektem jest wymiana guanozyno-5-difosforanu (GDP) na guanozyno-5-trifosforan (GTP) i oddysocjowanie kompleksu $\beta\gamma$. Zaktywowana podjednostka α oddziałuje z fosfolipazą $C\beta$ ($PLC\beta$), która indukuje hydrolizę fosfatydyloinozytylo-4,5-bisfosforanu (PIP_2) do 1,2-diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP_3). IP_3 oddziałuje z odpowiednim receptorem (IP_3R) znajdującym się w błonie retikulum endoplazmatycznego. Aktywacja IP_3R skutkuje otwarciem kanału jonowego tego receptora i uwolnieniem jonów wapnia (Ca^{2+}) z retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy. Z kolei DAG, wraz z Ca^{2+} , bierze udział w aktywacji kinazy białkowej C (PKC), co prowadzi m.in. do dalszego dynamicznego wzrostu stężenia wapnia w cytoplazmie na skutek napływu Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

1.1.2 Regulacja ekspresji i funkcji

Odpowiedź komórki na skutek związania α_1 -AR z naturalnymi ligandami lub lekami może powodować zmiany wrażliwości tych receptorów na oddziaływanie z ligandem, zmiany ich ekspresji w błonie komórkowej oraz zmiany na poziomie transkrypcji [Michelotti et al., 2000]. Procesy te są dynamicznie regulowane w czasie, a głównym mechanizmem w tym pośredniczącym jest fosforylacja [García-Sáinz et al., 2000, Vázquez-Prado et al., 2003]. α_1 -AR charakteryzują się stosunkowo dużą liczbą miejsc fosforylacji, z których większość znajduje się w obszarze C-końca oraz trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej. Miejsca te jednak nie są konserwatywne między podtypami, a ich znaczenie funkcjonalne nie zostało jeszcze w pełni wyjaśnione [Akinaga et al., 2019].

Przeważnie, ekspozycja α_1 -AR na działanie agonisty wiąże się z ich desensytyzacją, internalizacją (która zwykle indukowana jest przy wysokich stężeniach agonistów) i/lub down-regulacją na poziomie mRNA (która zwykle przebiega wolniej i przy niższych stężeniach agonistów) [Rajagopal and Shenoy, 2018, Izzo Jr et al., 1994]. Niemniej jednak kinetyka tych zmian może się znacznie różnić w zależności od podtypu α_1 -AR. W szczurzych fibroblastach wykazano bowiem, że podtyp α_{1A} jest bardziej odporny na desensytyzację indukowaną przez oddziaływanie z NA i wolniej ulega internalizacji niż pozostałe dwa podtypy [Vázquez-Prado et al., 2003]. Podobne różnice między podtypami α_1 -AR zaobserwowano w procesie down-regulacji [Yang et al., 1999]. Może to wynikać ze zróżnicowanej lokalizacji podtypów α_1 -AR w obrębie komórki, a tym samym ich dostępności dla ligandów. W latach 90. XX wieku proponowano, że α_{1A} -AR jest ekspresjonowany w głównej mierze wewnątrzkomórkowo, podczas gdy α_{1B} -AR na powierzchni komórki [Hirasawa et al., 1997], co mogło by tłumaczyć słabszy efekt indukowany przez NA za pośrednictwem podtypu α_{1A} . Jednakże w innych badaniach wykazano, że α_{1D} -AR jest zlokalizowany przede wszystkim wewnątrzkomórkowo (gdzie charakteryzuje się aktywnością konstytutywną), natomiast α_{1A} -AR może być w porównywalnym stopniu ekspresjonowany w błonie komórkowej jak i wewnątrz komórki [McCune et al., 2000, Chalothorn et al., 2002, Wang et al., 2007]. Co więcej, istnieją doniesienia sugerujące, że wszystkie podtypy α_1 -AR mogą być zlokalizowane zarówno na powierzchni jak i wewnątrz komórki, i nie wykazywać w tym aspekcie znacznych różnic [McGrath, 2015].

Jak wcześniej wspomniano, wyniki badań właściwości farmakologicznych poszczególnych podtypów α_1 -AR nie zawsze są spójne. W tym przypadku szczególne utrudnienie w oznaczeniu ich lokalizacji w komórce, poza brakiem selektywnych ligandów, stanowi niespecyficzność komercyjnie dostępnych przeciwciał [Jensen et al., 2009, Böhmer et al., 2014]. Ponadto, wyniki tych badań są silnie zależne od zastosowanych linii komórkowych i agonistów. Przykładowo, w komórkach pochodzenia ludzkiego HEK293 wykazano, że podtyp α_{1A} jak najbardziej może ulegać szybkiej desensytyzacji i internalizacji – pod warunkiem, że jest aktywowany w wyniku działania oksymetazoliny, a nie NA [Akinaga et al., 2013]. W sekwencji aminokwasowej α_1 -AR udało się nawet wyodrębnić konkretne miejsca ulegające fosforylacji w przypadku aktywacji receptora przez oksymetazolinę i są one zupełnie różne od tych, które ulegają fosforylacji gdy receptor oddziałuje z NA [Alcántara-Hernández et al., 2017]. Dowodzi to istnienia wzorów fosforylacji α_1 -AR w zależności od zastosowanego liganda i stanowi przypomnienie, że właściwości związków oddziałujących z receptorami (w tym leków) wykraczają poza prosty podział na agonistów i antagonistów.

W badaniach na szczurzych fibroblastach i komórkach HEK293 wykazano również, że podtypy α_1 -AR mogą ulegać, paradoksalnie, up-regulacji w wyniku działania agonisty [Hein and Michel, 2007]. Tu ponownie, różnice w regulacji podtypów α_1 -AR na poziomie mRNA mogą zależeć od linii komórkowej i użytego liganda, jednak wiele wskazuje na to, że wynikają także z aktywacji różnych ścieżek sygnałowych przez poszczególne podtypy [Lei et al., 2002].

1.1.3 Rola w układzie sercowo-naczyniowym i moczowo-płciowym

W tkankach obwodowych zróżnicowana dystrybucja i funkcje podtypów α_1 -AR są stosunkowo dobrze scharakteryzowane, szczególnie w układzie sercowo-naczyniowym i moczowo-płciowym [Michelotti et al., 2000, Cotecchia et al., 2015, Akinaga et al., 2019, Perez, 2021]. Wiedza na temat udziału α_1 -AR w promowaniu skurczu naczyń krwionośnych została z powodzeniem przełożona na opracowanie leków, które są obecnie powszechnie stosowane. W klinice związki o działaniu agonistycznym względem α_1 -AR, jak NA i fenylefryna, podaje się w celu podnie-

sienia ciśnienia tętniczego krwi w warunkach wstrząsu anafilaktycznego. Agoniści α_1 -AR wchodzi również w skład leków dostępnych bez recepty, które łagodzą objawy przeziębienia i grypy poprzez zmniejszenie przekrwienia i obrzęku śluzówki nosa (jak fenylefryna i oksymetazolina). Co ciekawe, część z nich wykazuje selektywność względem podtypu α_{1A} [Akinaga et al., 2013].

Spośród związków oddziałujących z α_1 -AR największy sukces terapeutyczny wydawało się, że odniosły leki α -adrenolityczne (tzw. α -blokery). Pierwszy z nich, prazosynę, wprowadzono do leczenia nadciśnienia tętniczego już w 1976 roku [Widecka, 2007]. Obecnie ich stosowanie zostało ograniczone ze względu na wywoływane skutki uboczne i zwiększanie ryzyka niewydolności serca. Jednak istnieją doniesienia sugerujące, że efekty te można by było zminimalizować poprzez zastosowanie antagonistów selektywnych względem α_{1D} -AR. Tłumaczy się to tym, że spośród α_1 -AR największy wpływ na ciśnienie krwi zdaje się wykazywać podtyp α_{1B} , podczas gdy podtyp α_{1D} jest w dużo mniejszym stopniu ekspresjonowany w sercu. Ponadto, myszy transgeniczne wykazujące konstytutywną aktywność α_{1B} -AR w sercu charakteryzują się zwiększoną podatnością na rozwinięcie niewydolności serca w wyniku jego ciśnieniowego przeciążenia [Perez, 2021]. Co szczególnie ciekawe w kontekście zróżnicowania α_1 -AR, w przeciwieństwie do podtypu α_{1B} , wiele badań wskazuje na kardioprotekcyjne właściwości agonistów oddziałujących selektywnie z podtypem α_{1A} [Cotecchia et al., 2015, Perez, 2021].

Wiedza na temat roli α_1 -AR w układzie moczowo-płciowym została z kolei z sukcesem wykorzystana do polepszenia farmakoterapii łagodnego przerostu prostaty. Zastosowanie tamsulozyny pozwoliło na zminimalizowanie skutków ubocznych leczenia, co przypisuje się jej selektywnemu antagonistycznemu działaniu względem podtypu α_{1A} [Akinaga et al., 2019, Proudman et al., 2020], który jest głównym podtypem α_1 -AR ekspresjonowanym w prostacie [Chapple et al., 1994, Faure et al., 1994]. Udział α_1 -AR w procesach kurczliwości prostaty, cewki moczowej, nasieniowodów i innych elementów męskiego układu rozrodczego ma też istotne znaczenie dla płodności. Badania z wykorzystaniem myszy transgenicznych typu knockout (KO) wykazały obniżenie wskaźnika płodności o 50% w sytuacji braku funkcjonalnego podtypu α_{1A} i aż o 90% w sytuacji unieczynnienia wszystkich trzech podtypów α_1 -AR [Sanbe et al., 2007].

1.1.4 Rola w ośrodkowym układzie nerwowym

W odróżnieniu do układu sercowo-naczyniowego i moczowo-płciowego, wiedza na temat roli α_1 -AR w ośrodkowym układzie nerwowym jest bardzo fragmentaryczna. Wprawdzie wiadomo, że receptory te podlegają ekspresji w mózgu [Unnerstall et al., 1985], jednak próby oznaczenia lokalizacji poszczególnych podtypów α_1 -AR spotkały się z nie lada trudnościami. Dodatkowym ograniczeniem, poza już wspomnianym brakiem wysoce selektywnych ligandów i specyficznych przeciwciał, okazała się w tym przypadku wybiórcza przepuszczalność bariery krew-mózg. Zróżnicowaną ekspresję podtypów α_1 -AR w mózgu udało się jednak oznaczyć dzięki rozwojowi inżynierii genetycznej oraz skonstruowaniu modeli transgenicznych myszy z fluorescencyjnie znakowanymi receptorami i myszy typu KO. Badania z ich wykorzystaniem wykazały, że podtypy α_{1A} i α_{1B} są szeroko rozpowszechnione w tkance mózgowej, a ich najwyższą ekspresję odnotowuje się głównie w neuronach takich struktur jak kora mózgowa, zespół jąder migdałowych, podwzgórze i mózdzek [Papay et al., 2004, Papay et al., 2006]. W porównaniu do nich podtyp α_{1D} charakteryzuje się niskim poziomem ekspresji w mózgu i jest zlokalizowany głównie w korze mózgowej, hipokampie i niektórych jądrach wzgórzowych [Sadalge et al., 2003].

Wykorzystanie w badaniach modeli *in vivo* ujawniło zróżnicowane zaangażowanie podtypów α_1 -AR również w przebieg procesów poznawczych [Nalepa et al., 2013]. U myszy transgenicznych typu CAM (ang. *constitutively active mutant*) wykazujących ogólnoustrojową nadekspresję podtypu α_{1A} w formie konstytutywnie aktywnej (α_{1A} -CAM) odnotowano wyraźnie lepsze wyniki w testach behawioralnych oceniających uczenie się i pamięć przestrzenną, w porównaniu do myszy typu dzikiego (WT, ang. *wild type*) [Doze et al., 2011]. Zwierzęta te wykazywały także krótszy czas bezruchu w testach zawieszenia za ogon i wymuszonego pływania oraz niższy poziom lęku w testach uniesionego labiryntu zerowego i jasnego-ciemnego pudełka, co wskazuje na przeciwdepresyjny i przeciwlękowy fenotyp myszy α_{1A} -CAM [Doze et al., 2009, Doze et al., 2011]. Ponadto, zaobserwowano u nich nasilenie zjawiska długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, ang. *long-term potentiation*) w hipokampie [Doze et al., 2011], co jest szczególnie interesujące w kontekście wysokiej ekspresji podtypu α_{1A} w tej strukturze i jego zaangażowania w regulację procesów neurogenezy [Perez, 2021].

W przypadku myszy wykazujących ogólnoustrojową nadekspresję podtypu α_{1B} w formie konstytutywnie aktywnej (α_{1B} -CAM) sytuacja jest zgoła inna. U zwierząt tych dochodzi do rozwoju synukleinopatii, progresywnej neurodegeneracji i zaburzeń lokomotorycznych przypominających objawy parkinsonizmu [Zuscik et al., 2000]. Fenotyp myszy α_{1B} -CAM wykazuje wiele podobieństw do przebiegu zaniku wieloukładowego (MSA, ang. *multiple system atrophy*), szczególnie pod względem niewydolności układu autonomicznego objawiającej się w postaci bradykardii oraz drastycznie obniżonego poziomu katecholamin i kortyzolu w osoczu, a także zaburzeń płodności i utraty wagi [Zuscik et al., 2000].

W przeciwieństwie do α_{1A} -AR i α_{1B} -AR, rola podtypu α_{1D} w ośrodkowym układzie nerwowym wydaje się być najslabiej poznana. Niemniej jednak dotychczas dostępne dane literaturowe sugerują jego zaangażowanie w procesy pamięci roboczej, uwagi i koordynacji ruchowej [Mishima et al., 2004]. Myszy transgeniczne typu KO wykazujące ogólnoustrojowy brak ekspresji α_{1D} -AR (α_{1D} -KO) charakteryzują się ograniczeniem zachowań eksploracyjnych w teście nowego środowiska, w porównaniu do myszy WT [Sadalge et al., 2003]. Co więcej, u zwierząt tych odnotowano zmniejszoną wrażliwość na bodźce termiczne, przy jednoczesnym braku wpływu mutacji na nocycępcję bodźców mechanicznych i chemicznych [Koshimizu et al., 2007, Nalepa et al., 2013].

W ostatnich latach rosnąca liczba badań poświęcana jest próbom wyjaśnienia udziału podtypów α_1 -AR w etiologii, patofizjologii i farmakoterapii zaburzeń psychicznych. W tym obszarze na szczególną uwagę zasługują zaburzenia depresyjne, gdyż są one bezpośrednio związane ze stresem, a ten z kolei z poziomem aktywacji układu noradrenergicznego. Zaangażowanie α_1 -AR w patofizjologię depresji i działanie leków przeciwdepresyjnych zostało już wielokrotnie wykazane i opisane [Nalepa and Vetulani, 1994, Vetulani and Nalepa, 1996, Vetulani and Nalepa, 2000, Maj, 2000, Nalepa et al., 2002, Stone et al., 2007, Nojimoto et al., 2010, Maletic et al., 2017, Proudman et al., 2020, Kusmider et al., 2020]. Wciąż jednak wiele pytań nie zostało w pełni wyjaśnionych, m.in. jak leki przeciwdepresyjne wpływają na poszczególne podtypy α_1 -AR, jaki może mieć to wpływ na wynik farmakoterapii i jaki potencjał terapeutyczny mogły by mieć leki o zwiększonej specyficzności względem podtypu α_1 -AR.

1.2 Leki przeciwdepresyjne

Depresja jest zaburzeniem afektywnym charakteryzującym się epizodami obniżonego nastroju, zmniejszonego popędu i utratą zdolności odczuwania przyjemności. To wyniszczająca choroba, mająca destrukcyjny wpływ na funkcjonowanie nie tylko jednostki, ale i całych rodzin. Zaburzenia snu, zmęczenie i utrata energii, problemy z pamięcią, koncentracją i w podejmowaniu decyzji oraz zmiany apetytu i wagi, które często towarzyszą depresji, uniemożliwiają choremu normalne funkcjonowanie i prowadzą do jego częściowego lub całkowitego wykluczenia z życia społecznego. Jednym z objawów zaburzeń depresyjnych są także nawracające myśli o śmierci, niepokój oraz myśli i próby samobójcze, co przyczynia się do wysokiej śmiertelności tej choroby. Ponadto, depresja stanowi czynnik ryzyka rozwoju innych chorób, w szczególności chorób układu krążenia, cukrzycy i uzależnień [Organization et al., 2019]. Uwzględniając fakt, że zaburzenia depresyjne dotyczą niemal 300 mln ludzi na świecie, wszystko to sprawia, że depresja generuje ogromne koszty ekonomiczne i społeczne [Collaborators et al., 2022]. W tym miejscu warto nadmienić, iż w momencie pisania niniejszej pracy wciąż trwa pandemia COVID-19, a jej wpływ na zdrowie psychiczne ludzi w ujęciu globalnym nie został jeszcze w pełni poznany. Choć konsekwencje gospodarcze i społeczne pandemii mają charakter długoterminowy, pierwsze analizy wskazują, że w 2020 roku doszło do zwiększenia częstości występowania zaburzeń depresyjnych aż o 27,6% w porównaniu do roku poprzedniego, w szczególności u kobiet i w młodszych grupach wiekowych [Santomauro et al., 2021].

Główną metodą leczenia depresji, obok psychoterapii, jest terapia farmakologiczna. Jej historia jest stosunkowo krótka, gdyż pierwszy lek przeciwdepresyjny (LPD), imipramina, został zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) w 1957 roku, czyli jedyne 65 lat temu. Był to przełomowy moment, który doprowadził do opracowania innych związków o działaniu przeciwdepresyjnym i trójpierścieniowej budowie (TLPD), podobnej do imipraminy, będących lekami pierwszego rzutu w leczeniu depresji przez trzy kolejne dekady. Niemal równolegle odkryto przeciwdepresyjne działanie leku przeciwgruźliczego, iproniazydu, co dało początek innej grupie LPD – inhibitorów monoaminooksydaz (IMAO). Lata 80. XX wieku stanowią następ-

ny milowy krok w farmakoterapii depresji. Wówczas zatwierdzenie przez FDA otrzymała fluoksetyna (znana pod nazwą handlową jako Prozac), która w krótkim czasie zaczęła być szeroko nadużywana w Stanach Zjednoczonych i potocznie nazywano ją „pigułką szczęścia”. Dało to początek rozwojowi nowej grupy LPD, selektywnym inhibitorom wychwyty zwrotnego serotoniny (SSRIs, ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*), które charakteryzują się innym mechanizmem działania niż TLPD oraz mniej dotkliwymi działaniami niepożądanymi i większym bezpieczeństwem terapii [Stolerman and Price, 2015, Pereira and Hiroaki-Sato, 2018]. Niestety, leki te nie przyczyniły się do zwiększenia skuteczności leczenia farmakologicznego depresji, podobnie jak opracowane później inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRIs, ang. *serotonin–norepinephrine reuptake inhibitors*) [Anderson, 2000, Machado and Einarson, 2010].



Rycina 1.3: Rys historyczny związków, które dały początek czterem głównym grupom leków przeciwdepresyjnych (na podstawie Lanni et al., 2009).

Obecnie, mimo dostępności kilku klas LPD, na które składa się łącznie kilkadziesiąt związków chemicznych, skuteczność farmakoterapii depresji wynosi około 70%. Oznacza to, że u co trzeciego pacjenta nie udaje się osiągnąć remisji choroby po zastosowaniu nawet czterech różnych LPD, a odsetek pacjentów cierpiących na depresję oporną na leczenie (TRD, ang. *treatment-resistant depression*) stanowi aż 30% [Voineskos et al., 2020, Gałęcki and Bliźniewska-Kowalska, 2021]. Ponadto, osiągnięcie odczuwalnych efektów działania LPD wymaga stosowania ich przez kilka tygodni, nierzadko miesięcy, co stanowi poważny problem psychiatrii klinicznej.

Wysoki wskaźnik niepowodzenia terapii farmakologicznej depresji (także w badaniach klinicznych) częściowo wiąże się z wysoką heterogenicznością tej choroby, bowiem na jej rozwój ma wpływ złożone współoddziaływanie czynników biologicznych, genetycznych, psychosocjalnych i środowiskowych. Sam termin „depresja” stanowi pewnego rodzaju uproszczenie, gdyż spośród zaburzeń depresyjnych wyróżnia się m.in. chorobę afektywną jednobiegunową, depresję w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej, depresję lękową, depresję urojeniową,

depresję sezonową, depresję poporodową i dystymię, które charakteryzują się zróżnicowanym przebiegiem i nasileniem objawów. Jednak niedoskonałość obecnie stosowanych LPD niewątpliwie wynika również z braku dostatecznej wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw tej choroby, jak i mechanizmów działania samych LPD. Ponieważ, choć ich bezpośrednie biochemiczne efekty są znane i dość dobrze opisane, nie tłumaczą w pełni efektu klinicznego uzyskanego w wyniku ich długotrwałego stosowania. Zatem z wielu powodów poszukiwanie nowych strategii farmakologicznych i punktów uchwytu jest niezbędne dla podwyższenia skuteczności, szybkości i bezpieczeństwa działania LPD.

1.2.1 Podział i mechanizmy działania

Leki przeciwdepresyjne powszechnie dzieli się w oparciu o ich budowę chemiczną i mechanizm bezpośredniego działania farmakologicznego związanego z punktem uchwytu. Zgodnie z tymi kryteriami wyróżnia się cztery podstawowe grupy LPD:

- **TLPD** - trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, będące nieselektywnymi inhibitorami wychwyty zwrotnego NA i serotoniny (5-HT),
- **SSRIs** - selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego 5-HT,
- **SNRIs** - selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego NA i 5-HT,
- **IMAO** - inhibitory monoaminooksydaz (MAO).

Pozostałe, mniej liczne, grupy LPD obejmują związki o innej budowie i/lub mechanizmie działania niż powyższe. Zalicza się do nich m.in.:

- **NRIs** (ang. *norepinephrine reuptake inhibitors*) - selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego NA,
- **TeCAs** (ang. *tetracyclic antidepressants*) - tetracykliczne leki przeciwdepresyjne,
- **NDRI**s (ang. *norepinephrine–dopamine reuptake inhibitors*) - selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego NA i dopaminy (DA),
- **SARIs** (ang. *serotonin antagonists and reuptake inhibitors*) - antagoniści receptorów serotoninowych i inhibitory wychwyty zwrotnego 5-HT,

a także pojedyncze związki, które w ostatnich latach zostały zatwierdzone przez FDA jak:

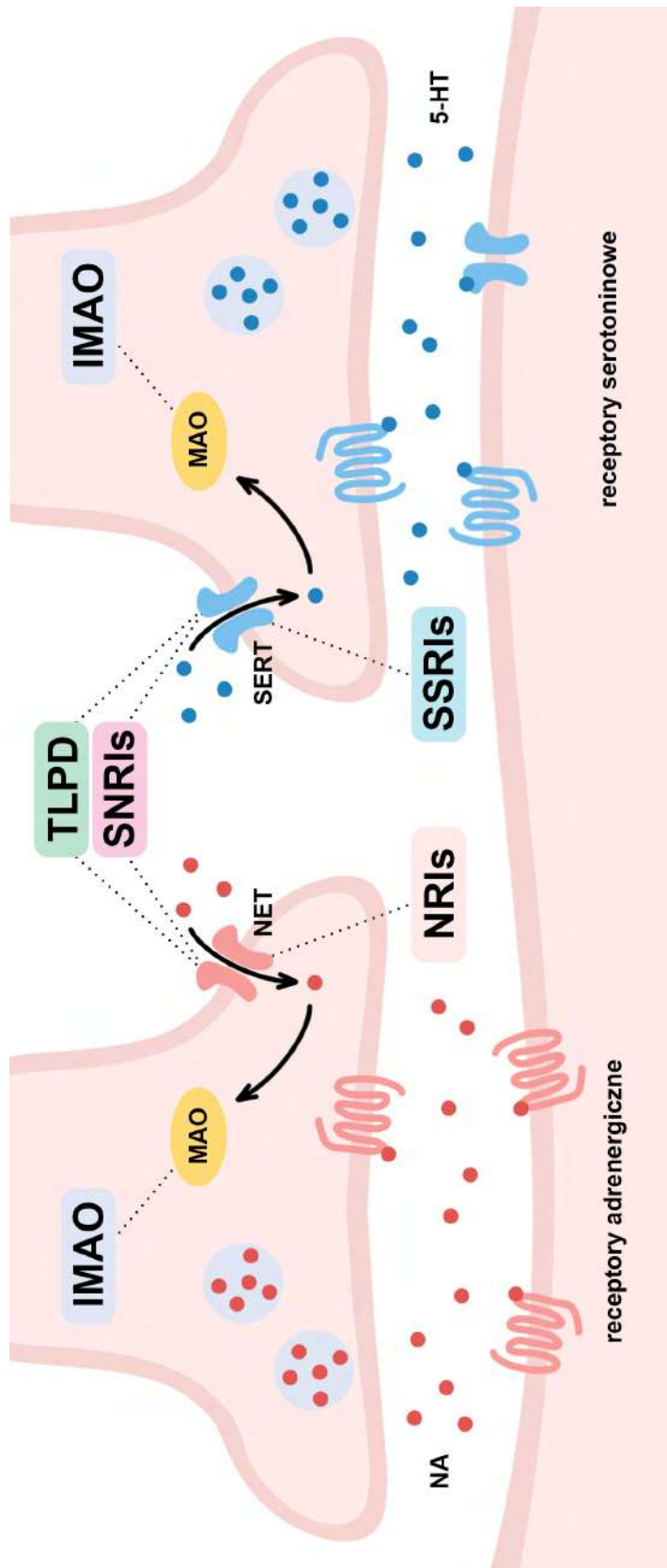
- esketamina - niekompetycyjny antagonist receptoru NMDA stosowany w leczeniu TRD,
- breksanolon - pozytywny modulator receptora GABA-A stosowany w leczeniu depresji poporodowej.

TLPD	imipramina amitryptylina	dezipramina nortryptylina	SSRIs	citalopram fluoksetyna	paroksetyna sertralina
IMAO	izokarboksazyd tranylcypromina	moklobemid selegilina	SNRIs	milnacipran wenlafaksyna	duloksetyna deswenlafaksyna
inne					
reboksetyna (NRI) bupropion (NDRI) esketamina mianseryna (TeCA) trazodon (SARI) breksanolon					

Rycina 1.4: Podstawowe grupy leków przeciwdepresyjnych z przykładowymi związkami.

Dostępność tak wielu różnych grup LPD może, pozornie, sugerować istnienie szerokiego wachlarza strategii farmakologicznych w leczeniu depresji. W rzeczywistości jednak, mechanizm działania większości LPD sprowadza się do zwiększenia stężenia monoamin w szczeliny synaptycznej na skutek hamowania ich wychwyty zwrotnego lub rozkładu oraz poprzez działanie na różnego typu receptory (Rycina 1.5).

TLPD, jak imipramina i amitryptylina, hamują wychwyt zwrotny NA i 5-HT, zwiększając tym samym ich stężenie w szczeliny synaptycznej i prowadząc do nasilenia aktywacji receptorów adrenergicznych i serotoninowych. Leki z tej grupy wykazują również działanie antagonistyczne względem α_1 -AR oraz receptorów muskarynowych i histaminowych H1, co jest przyczyną szeregu uciążliwych działań niepożądanych stosowania TLPD. Zalicza się do nich m.in. sedację, hipotensję, wzrost łaknienia i masy ciała, a także suchotę śluzówek, zaparcia i retencję moczu. Z kolei SNRIs, jak milnacipran i wenlafaksyna, podobnie jak TLPD hamują wychwyt zwrotny NA i 5-HT, jednak wykazują bardzo słabe działanie receptorowe.



Rycina 1.5: Transmisja synaptyczna i mechanizmy działania leków przeciwdepresyjnych po podaniu jednorazowym (na podstawie Lanni et al., 2009 i Pereira and Hiroaki-Sato, 2018). Schemat przedstawia proces uwalniania noradrenaliny (NA, kolor czerwony) i serotoniny (5-HT, kolor niebieski) z pęcherzyków synaptycznych neuronów presynaptycznych do szczeliny synaptycznej. Uwolnione w ten sposób NA i 5-HT mogą oddziaływać na receptory zlokalizowane pre- i postsynaptycznie, ulegać wychwytywi zворотnemu przez transporter NA (NET) i transporter 5-HT (SERT) lub być metabolizowane przez monoaminooksydazy (MAO, głównie MAO-A). Na schemacie zaznaczono również punkty uchwytu kilku podstawowych grup leków przeciwdepresyjnych: inhibitorów monoaminooksydazy (IMAO), trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (TLPD) oraz selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego NA (NRIs), 5-HT (SSRIs) lub obu tych monoamin (SNRIs).

Dzięki temu leki z grupy SNRIs nie wywołują wspomnianych działań niepożądanych lub czynią to w znacznie mniejszym stopniu. Wciąż jednak pod tym względem największą przewagę mają leki z grupy SSRIs, jak citalopram i fluoksetyna, które hamują wychwyt zwrotny tylko 5-HT i wykazują bardzo słabe lub brak działania receptorowego wobec innych układów. Niestety, mimo ograniczonych działań niepożądanych, bywają źle tolerowane przez pacjentów z powodu wywoływania zaburzeń funkcji seksualnych, dolegliwości ze strony układu pokarmowego, bólów głowy i senności [Maj, 2000, Hillhouse and Porter, 2015].

Odrębną grupę LPD stanowią IMAO, które podobnie jak TLPD, SNRIs i SSRIs zwiększają stężenie monoamin w szczeliny synaptycznej, jednak odbywa się to na drodze hamowania aktywności enzymów je metabolizujących – MAO-A i MAO-B. Leki te można podzielić ze względu na selektywność i odwracalność działania, przy czym w leczeniu depresji zastosowanie mają głównie związki odwracalne, selektywne względem MAO-A (np. moklobemid). Przeszkodą w szerokim stosowaniu IMAO, szczególnie nieselektywnych, w terapii depresji są rozległe działania niepożądane, niebezpieczne interakcje ze składnikami pokarmowymi (tyraminą zawartą w nabiale) i niektórymi lekami oraz ciężkie zatrucia przy przedawkowaniu ([Maj, 2000, Hillhouse and Porter, 2015].

Spośród mniej licznych grup LPD można wyróżnić NRIs, których pierwszym przedstawicielem była reboksetyna. Jej mechanizm działania opiera się na selektywnym hamowaniu wychwytu zwrotnego NA i osiąga skuteczność działania przeciwdepresyjnego porównywalną do dezipraminy i fluoksetyny. Przy czym, w odróżnieniu od dezipraminy wykazuje słabe powinowactwo do α_1 -AR oraz receptorów muskarynowych i histaminowych H₁, a w odróżnieniu od fluoksetyny nie wywołuje dysfunkcji seksualnych i dolegliwości ze strony układu pokarmowego [Hajós et al., 2004].

Jeszcze inną grupę LPD stanowią TeCAs, która obejmuje związki o budowie tetracyklicznej. Jednym z nich jest mianseryna, która nasila przekazywanie noradrenergiczne w sposób pośredni - poprzez działanie antagonistyczne względem autoreceptorów, α_2 -AR, do których ma wysokie powinowactwo [Nalepa and Vetulani, 1994]. Prowadzi to do zahamowania ujemnego sprzężenia zwrotnego i w konsekwencji do zwiększenia stężenia NA w szczeliny synaptycznej. Związek ten wykazuje działanie antagonistyczne również wobec receptorów

histaminowych H1, jednak wynikający z tego efekt nasenny można osłabić stosując mianserynę w politerapii z lekiem z grupy SSRIs, jednocześnie zmniejszając nasilenie zaburzeń funkcji seksualnych wywoływanych przez leki z tej grupy [Ferrerri et al., 2001, Łoza et al., 2007].

1.2.2 Rola pierwiastków w farmakoterapii depresji

Łączenie LPD o różnym mechanizmie działania (np. serotoninowym i noradrenergicznym) jest częstym podejściem w farmakoterapii depresji, szczególnie w przypadkach, gdy zastosowanie leku pierwszego rzutu nie przyniosło zadowalających rezultatów. Politerapia ma uzasadnienie również w sytuacjach, gdy ze względu na złożone potrzeby pacjenta stosowanie LPD musi zostać uzupełnione o leki nasenne, przeciwpsychotyczne lub przeciwłękowe. Jednym ze środków rekomendowanych do augmentacji w terapii zaburzeń depresyjnych jest lit. Pierwiastek ten, podobnie do mianseryny, charakteryzuje się wysokim stosunkiem korzyści klinicznych do działań niepożądanych, a skuteczność leczenia przeciwdepresyjnego po połączeniu z jego przyjmowaniem może wzrosnąć nawet ponad 3-krotnie [Łoza et al., 2007]. Istnieją doniesienia wskazujące, że przeciwdepresyjny efekt terapii może poprawiać suplementacja również innych pierwiastków. Na szczególną uwagę w tym obszarze zasługują cynk (Zn), miedź (Cu), magnez (Mg) i wapń (Ca) [Poleszak et al., 2005, Siwek et al., 2005, Galeotti et al., 2006, Siwek et al., 2009].

Cynk występuje w organizmie niemal wyłącznie wewnątrzkomórkowo, w formie związanej m. in. z metaloproteinazami. Uznawany jest za neuroprzekaźnik pierwszego rzędu i regulator transmisji synaptycznej, a jego obecność jest szczególnie istotna dla prawidłowej aktywności dehydrogenazy glutaminianu i polimerazy RNA [Nowak et al., 2005, Sensi et al., 2009, Tóth, 2011]. W testach na zwierzętach wykazano przeciwdepresyjne działanie cynku, co przypuszczalnie wynika z hamującego działania tego pierwiastka na receptor NMDA [Poleszak et al., 2008, Szewczyk et al., 2010]. Zaobserwowano również, że niedobór cynku zaburza skuteczność działania LPD różnego typu [Młyniec and Nowak, 2012, Młyniec et al., 2013].

Miedź, podobnie do cynku, reguluje w organizmie wiele istotnych procesów biochemicznych, w tym syntezę hemoglobiny, metabolizm glukozy, formowanie mieliny i syntezę tryptofanu [Schlegel-Zawadzka and Nowak, 2000, Collins and

Klevay, 2011]. Co szczególnie istotne w kontekście depresji, obecność miedzi jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania enzymów ścieżki syntezy i rozkładu katecholamin – hydroksylazy tyrozynowej, β -hydroksylazy dopaminy i MAO [Schlegel-Zawadzka and Nowak, 2000]. Ponadto, miedź wykazuje działanie antagonistyczne wobec receptorów NMDA, AMPA i GABA-A [Opazo et al., 2014]. W badaniach na zwierzętach zaobserwowano, że niedobór miedzi skutkuje obniżeniem poziomu NA w mózgu. Prawdopodobnie wynika to ze zmniejszenia aktywności β -hydroksylazy dopaminy, co odnotowuje się również w surowicy pacjentów chorujących na depresję [Prohaska and Smith, 1982, Siwek et al., 2005]. Rola cynku i miedzi w etiopatogenezie depresji wydaje się być ściśle związana ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego. W szczególności z działaniem zależnych od tych pierwiastków dwóch izoform dysmutazy ponadtlenkowej – SOD-1 i SOD-3, które katalizują reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego [Russo, 2010, Moylan et al., 2014]. Co więcej, u pacjentów cierpiących na depresję odnotowuje się wyraźne obniżenie stężenia cynku i zwiększenie stężenia miedzi w surowicy w porównaniu do osób zdrowych, dlatego poziomy tych pierwiastków w surowicy proponowane są jako potencjalne obwodowe markery zaburzeń depresyjnych [Russo, 2011, Siwek et al., 2013, Ni et al., 2018]. Istnieje również potencjalna korelacja pomiędzy nasileniem zaburzeń afektywnych a stężeniami różnych pierwiastków w surowicy, np. stosunku stężeń Zn/Cu i Mg/Cu [Zieba et al., 2000, Russo, 2011].

Magnez jest kofaktorem ponad 300 enzymów i zaangażowany jest m.in. w reakcje syntezy ATP i kwasów nukleinowych [Swaminathan, 2003]. W formie jonowej blokuje receptor NMDA w sposób zależny od napięcia, dlatego w warunkach niedoboru magnezu w mózgu dochodzi do niekontrolowanego napływu jonów wapniowych do komórek i uwalniania glutaminianu, co skutkuje nadmierną depolaryzacją neuronów i dysfunkcją ich działania [Nowak et al., 1984, Mayer et al., 1984]. W rezultacie, przy niedoborze magnezu może dochodzić do rozwoju nadpobudliwości nerwowo-mięśniowej, arytmii serca, a także zaburzeń afektywnych [Swaminathan, 2003]. Podobnie jak w przypadku cynku, u pacjentów z depresją obserwuje się obniżenie poziomu magnezu w surowicy i jego normalizację po leczeniu np. litem [Zieba et al., 2000, Eby and Eby, 2006]. Wykazano również, że suplementacja magnezem zwiększa efektywność farmakoterapii depre-

sji, a nawet sama w sobie wykazuje działanie przeciwdepresyjne [Poleszak et al., 2004, Eby III and Eby, 2010].

Wapń bierze udział w regulacji takich zjawisk jak krzepnięcie krwi i skurcz mięśni, a także uwalnianie neurotransmiterów i transmisja synaptyczna (w tym długotrwałe wzmocnienie i osłabienie synaptyczne – LTP i LTD). Jak opisano powyżej, jony wapniowe pośredniczą w procesie ekscytotoksyczności, a ich niekontrolowany napływ może prowadzić do dysfunkcji i degeneracji neuronów [Yamawaki et al., 1998, Arundine and Tymianski, 2003, Deutschenbaur et al., 2016]. Wykazano również, że związki blokujące kanały wapniowe mogą redukować objawy depresyjne zarówno w badaniach na zwierzętach, jak i u ludzi w politerapii z SSRI [Galeotti et al., 2006, Tully et al., 2018].

1.2.3 Zmiany adaptacyjne w wyniku wielokrotnego stosowania

Poczynając od odkrycia pierwszych LPD, historia farmakoterapii depresji i przyjęty podział LPD wspierały hipotezę, w myśl której depresja wynika z obniżonego stężenia monoamin (głównie NA i 5-HT) w strukturach mózgowych odpowiedzialnych za procesy poznawcze i emocje, a terapeutyczne działanie LPD wynika z normalizacji poziomu tych neuroprzekaźników [Schildkraut, 1965, Stahl, 2013]. Jednak niektóre aspekty monoaminergicznej teorii depresji od zawsze budziły pewne wątpliwości. Pierwszym z nich jest fakt, że osiągnięcie efektu terapeutycznego u pacjentów wymaga wielokrotnego i kilkutygodniowego stosowania LPD, podczas gdy do nasilenia transmisji monoaminergicznej dochodzi w stosunkowo krótkim czasie już po pojedynczym podaniu leku [Krishnan and Nestler, 2008, Pereira and Hiroaki-Sato, 2018]. Drugim jest brak udowodnionego działania przeciwdepresyjnego związków, które nasilają uwalnianie monoamin do szczeliny synaptycznej (np. amfetamina) lub hamują ich wychwyt (np. kokaina) [Pilc et al., 2000, Lanni et al., 2009]. Co więcej, istnieją LPD, które osłabiają transmisję monoaminergiczną. Przykładowo, tianeptyna działa jako allosteryczny modulator transportera 5-HT (SERT) nasilając wychwyt zwrotny 5-HT, a mimo tego wykazuje działanie przeciwdepresyjne. Zatem jeżeli zarówno inhibitory (SSRI) jak i aktywatory (tianeptyna) wychwyty 5-HT działają przeciwdepresyjnie, to jest wysoce wątpliwe by efekt ten wynikał bezpośrednio i wyłącznie ze zmiany nasilenia transmisji serotoninowej [Pilc et al., 2000]. W sprzeczności z pierwotnie sformuło-

waną teorią monoaminergiczną pozostają również wyniki badań, w których wykazano, że u osób zdrowych obniżenie poziomu monoamin nie wywołuje objawów depresji. Może jednak prowadzić do nawrotu choroby u pacjentów w remisji [Ruhé et al., 2007, Pereira and Hiroaki-Sato, 2018].

Wobec powyższych, obniżenie transmisji monoaminergicznej w mózgu nie jest wystarczającym czynnikiem do wywołania depresji, choć nie zmienia to faktu, że terapeutyczne działanie LPD jest pośrednio związane z regulacją poziomu monoamin. Przeniosło to uwagę badaczy w stronę zmian farmakologicznych i biochemicznych, do których dochodzi w wyniku wielokrotnych podań LPD i których nie obserwuje się po podaniu jednorazowym. Pierwszą tego typu obserwacją była down-regulacja β -AR, polegająca na zmniejszeniu gęstości tych receptorów i akumulacji wtórnego przekaźnika, cAMP, w odpowiedzi na działanie NA [Vetulani and Sulser, 1975]. Efekt ten wykazano w efekcie wielokrotnych podań zarówno TLPD jak i IMAO, jednak w przypadku leków z grupy SSRIs otrzymywane wyniki były niejednoznaczne [Sugrue, 1983, Nalepa and Vetulani, 1993, Maj, 2000]. Ponadto, stosowanie leków β -adrenolitycznych (tzw. β -blokerów) nie wywołuje efektu przeciwdepresyjnego, a dalsze badania wykazały, że down-regulacja β -AR będąca wynikiem wielokrotnych podań niektórych LPD ma przypuszczalnie charakter kompensacyjny i wiąże się z utrzymaniem homeostazy w odpowiedzi na lek nasilający transmisję noradrenergiczną [Cowen et al., 1985].

Rozwój LPD z grupy SSRIs przyczynił się do zwiększenia liczby badań poświęconych receptorom serotoninowym. Wykazano, że przy wielokrotnym stosowaniu większość LPD, szczególnie TLPD i IMAO, nasila transmisję serotoninową. Z kolei SSRIs i niektóre SNRIs (np. wenlafaksyna) nasilają transmisję serotoninową po podaniu jednorazowym, a przy wielokrotnym stosowaniu mogą ją osłabiać. W toku dalszych badań zaobserwowano, że zarówno u zwierząt jak i u ludzi wielokrotne podania SSRIs skutkują zmniejszeniem wrażliwości receptorów 5-HT_{1A} na działanie 5-HT. Receptory te działają jako autoreceptory, a ich aktywacja prowadzi do zmniejszenia uwalniania 5-HT do szczeliny synaptycznej. Zatem wynik ten mógł sugerować, że opóźnienie efektu terapeutycznego leków z grupy SSRIs wiąże się z czasem, który jest potrzebny do zmiany wrażliwości receptorów na skutek zwiększonego poziomu 5-HT w początkowym okresie stosowania leku. Idąc tym tropem, politerapia łącząca SSRIs z lekami selektywnie blokującymi receptory

5-HT_{1A} mogła by dawać szybszy efekt terapeutyczny, jednak niestety nie znalazło to odzwierciedlenia w psychiatrii klinicznej [Maj, 2000, Harmer et al., 2017].

Istnieją również doniesienia, które w kontekście zmian adaptacyjnych w wyniku wielokrotnych podań LPD podkreślały rolę receptorów α_2 -AR. Receptory te mogą działać zarówno jako autoreceptory na zakończeniach neuronów noradrenergicznych (hamując uwalnianie NA) jak i heteroreceptory na zakończeniach neuronów serotoninowych (hamując uwalnianie 5-HT). Proponowano, że wzrost poziomu NA w początkowym okresie stosowania LPD prowadzi do zmniejszenia wrażliwości α_2 -AR w niektórych rejonach mózgu, a w konsekwencji do nasilenia transmisji noradrenergicznej i serotoninowej [Maj et al., 1984, Elhwuegi, 2004].

Inną zmianą, w przeciwieństwie do down-regulacji β -AR, jaką zaobserwowano w układzie noradrenergicznym po wielokrotnych podaniach LPD, jest up-regulacja α_1 -AR. Efekt ten potwierdzono w badaniach behawioralnych, biochemicznych i elektrofizjologicznych, dla szeregu LPD z różnych grup: TLPD, citalopramu (SSRI) i mianseryny (TeCA) [Vetulani et al., 1984, Nowak and Przeglasiński, 1988], a także milnacipranu (SNRI) [Maj et al., 2000] i reboksetyny (NRI) [Rogoz and Kolasiewicz, 2001]. Wykazano, że zarówno imipramina i dezipramina (TLPD), jak i wenlafaksyna i milnacipran (SNRIs), a także citalopram (SSRI) i mianseryna (TeCA) stosowane wielokrotnie nasilają wypieranie [³H]-prazosyny przez fenylefrynę z α_1 -AR w korze mózgowej, wzgórzu i hipokampie. Wskazuje to na wzrost powinowactwa tych receptorów do ich agonistów i stanowi spójną obserwację, że LPD o różnym działaniu farmakologicznym po podaniu jednorazowym dają podobne zmiany adaptacyjne w wyniku wielokrotnego stosowania [Menkes et al., 1983, Klimek et al., 1991, Maj et al., 2000].

1.2.4 Kierunki poszukiwań nowych strategii farmakologicznych

Odkrycie zmian wrażliwości i gęstości receptorów po wielokrotnych podaniach LPD, szczególnie w układach neuroprzekaźników, na które dany lek nie wpływa po podaniu jednorazowym, skłoniło badaczy do poszerzenia pola poszukiwań mechanizmów odpowiadających za efekt terapeutyczny LPD. Do wyznaczenia nowego kierunku badań przyczynił się również rozwój nauki i zwiększenie wiedzy na temat szlaków molekularnych i komórkowych, które regulują funkcje neuronów. Dzięki temu uwaga badaczy została skupiona na wewnątrzkomórkowych szlakach

przekazywania sygnału oraz mechanizmach regulacji ekspresji genów i translacji białek. W badaniach podejmowano próby określenia wpływu LPD na wiele elementów wewnątrzkomórkowych, w tym białka G i ich podjednostki, wtórne przekaźniki głównych szlaków sygnałowych (cAMP, IP₃, DAG), kinazy białkowe (PKC, CaMKII, ERK1/2, GSK-3 β), czynniki transkrypcyjne (CREB) i inne [Nalepa and Sulser, 2004, Duric and Duman, 2013].

Przełomową obserwację stanowiły wyniki świadczące o tym, że zdecydowana większość LPD podnosi poziom neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. *brain derived neurotrophic factor*) [Nibuya et al., 1996]. Czynniki ten odgrywa szczególną rolę na etapie rozwoju układu nerwowego w tworzeniu, różnicowaniu i przeżyciu neuronów, ale również na późniejszych etapach w procesach plastyczności synaptycznej. Zjawisko to leży u podstaw uczenia się, pamięci i zdolności układów neuronalnych do adaptacji, a pośredniczą w nim takie mechanizmy jak regulacja presynaptycznych mechanizmów uwalniania neuroprzekaźników, postsynaptyczna sygnalizacja Ca²⁺, zmiany w budowie i lokalizacji receptorów glutaminianu oraz funkcji i liczby połączeń synaptycznych [Citri and Malenka, 2008, Castrén and Kojima, 2017]. Do zwiększenia poziomu BDNF w wyniku działania LPD może dochodzić na skutek nasilonej transmisji monoaminergicznej i aktywacji kinaz białkowych (np. PKC, CaMKII, Akt) fosforylujących czynnik transkrypcyjny CREB, który reguluje ekspresję BDNF [Kornhauser et al., 2002, Wang et al., 2018]. Co więcej, u pacjentów chorujących na depresję odnotowano zmniejszenie objętości hipokampa, a w badaniach na zwierzętach odwrócenie atrofii dendrytycznej wywołanej stresem dzięki podawaniu LPD, co łącznie doprowadziło do sformułowania neurotroficznego hipotezy depresji [Duman and Li, 2012]. Wykazano również, że u zwierząt w wyniku przewlekłego stresu fizycznego lub psychicznego dochodzi do zaburzeń sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i ekspresji genów oraz funkcji połączeń synaptycznych i ich liczby - szczególnie w obszarach korowych i limbicznych związanych z depresją, takich jak kora przedczołowa i hipokamp [Pittenger and Duman, 2008, McEwen and Morrison, 2013, McEwen et al., 2015]. Ponadto, na skutek przewlekłego stresu dochodzi do obniżenia poziomu BDNF w mózgu zarówno u zwierząt, jak i u ludzi [Duman and Monteggia, 2006, Castrén, 2014]. Z kolei obniżenie poziomu BDNF może sprzyjać neurodegeneracji neuronów na skutek zmniejszenia aktywacji antyapoptotycznej

ścieżki PI3K-Akt i hamowania GSK-3 β - kinazy, która jest zaangażowana w wiele procesów komórkowych, takich jak sygnalizacja komórkowa, proliferacja i plastyczność, a w formie aktywnej wykazuje działanie proapoptotyczne [Grimes and Jope, 2001b, Małczyńska et al., 2019].

Odpowiedź organizmu na stres jest ściśle związana z nasileniem aktywacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (oś HPA, ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*), która reguluje wydzielanie NA, adrenaliny i glikokortykosteroidów z nadnerczy do krwiobiegu. Do ostatniej grupy zaliczane są m.in. kortyzol (u ludzi) i kortykosteron (u zwierząt), które potocznie nazywane są hormonami stresu. Podwyższony poziom glikokortykosteroidów może prowadzić do uszkodzenia neuronów i stymulować procesy immunologiczne o charakterze zapalnym (takie jak synteza i sekrecja białek ostrej fazy oraz cytokin prozapalnych). Sugeruje się, że może to wynikać z nasilenia uwalniania glutaminianu do poziomu, w którym stężenie tego neuroprzekaźnika w przestrzeni międzykomórkowej wykazuje działanie ekscytotoksyczne na neurony [Popoli et al., 2012]. Badania układu glutaminianergicznego w kontekście farmakoterapii depresji dają z resztą bardzo obiecujące wyniki. Związki będące antagonistami NMDAR wykazują działanie przeciwdepresyjne, natomiast wielokrotne podanie LPD obniża powinowactwo tego receptora do jego agonistów [Nowak et al., 2010]. Ponadto, opisanie przeciwdepresyjnego działania ketaminy (związku powszechnie stosowanego w anestezjologii, będącego niekompetycyjnym antagonistą NMDAR) stanowiło przełomowe odkrycie w historii farmakoterapii depresji [Berman et al., 2000], bowiem przeciwdepresyjny efekt ketaminy uzyskiwany jest w ciągu kilku godzin i utrzymuje się do kilku dni, na dodatek w wyniku pojedynczego podania. Aktualne doniesienia wskazują, że mechanizm przeciwdepresyjnego działania ketaminy można podzielić na dwa etapy. W pierwszym, na skutek antagonizmu NMDAR dochodzi do zwiększenia uwalniania glutaminianu i nasilenia aktywacji receptorów AMPA (AMPA). W drugim, na skutek nasilenia aktywacji AMPAR dochodzi do zmian w zakresie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, które prowadzą do aktywacji kinazy mTOR. Potencjalnie, etap ten może zachodzić za pośrednictwem kilku ścieżek: (1) poprzez aktywację zależnych od napięcia kanałów wapniowych typu L, co prowadzi do zwiększonego uwalniania BDNF i aktywacji ścieżki TrkB-Akt-mTOR [Lepack et al., 2015], (2) poprzez aktywację szlaków MEK/ERK i PI3K/AKT

[Mao et al., 2004, Wang et al., 2004], (3) poprzez hamowanie kinazy syntazy glikogenu β (GSK-3 β), która hamuje mTOR [Zoncu et al., 2011, Beurel et al., 2011]. Co ciekawe w kontekście farmakoterapii depresji, działanie hamujące wobec GSK-3 β wykazuje również lit, a jego wysoka dawka może wywoływać efekt przeciwdepresyjny w sposób podobny do ketaminy [Grimes and Jope, 2001a, Beurel et al., 2011].

Podsumowując, dotychczas w kontekście patofizjologii depresji i działania LPD sformułowano wiele hipotez, spośród których można wyróżnić hipotezę monoaminergiczną, neurotroficzną, neuroplastyczną, kortykosteroidową, immunologiczną, glutaminianergiczną i inne. Hipotezy te nie wykluczają się wzajemnie, a wręcz przeciwnie, wydają się przenikać i uzupełniać jak elementy skomplikowanej układanki, której końcowy obraz niestety nadal pozostaje poza zasięgiem wzroku badaczy. Mimo dekad badań, rozwoju nauki i obiecujących odkryć, wciąż żadna hipoteza nie tłumaczy w pełni patofizjologii depresji, a dostępna farmakoterapia nie jest zadowalająca. Analizując najnowsze doniesienia można odnieść wrażenie, że badacze postawili sobie za cel zgłębić mechanizmy działania LPD w jak najdrobniejszym szczególe. Podejście to samo w sobie oczywiście nie jest złe, aczkolwiek wymaga uważnej analizy na każdym poziomie szczegółowości, gdyż wiąże się z ryzykiem otrzymania niejednoznacznych lub niespójnych wyników w sytuacji pominięcia jakiegoś elementu na wcześniejszym etapie. Wiele wskazuje na to, że w przypadku patofizjologii depresji i działania LPD tym brakującym elementem układanki mogą być α_1 -AR, a dokładniej ich funkcjonalne zróżnicowanie.

Pozostaje bez wątpliwości, że LPD wpływają w sposób bezpośredni lub pośredni na układ noradrenergiczny. Stanowi on wspólny mianownik monoaminergicznej i kortykosteroidowej hipotezy depresji, poprzez zaangażowanie w mechanizmy odpowiedzi organizmu na stres również hipotez neuroplastycznej i immunologicznej, a poprzez wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe także neurotroficznej i glutaminianergicznej hipotezy depresji. Podobnie udział α_1 -AR w efektach LPD został wielokrotnie wykazany, jednak rosnąca liczba doniesień wskazuje na to, że udział ten jest zróżnicowany w zależności od podtypu α_1 -AR. Przykładowo, wielokrotne podania imipraminy zwiększają poziom mRNA i gęstość receptorową podtypu α_{1A} , ale nie α_{1B} , w korze przedczołowej szczurów [Nalepa et al., 2002], szereg LPD o różnym mechanizmie działania charakteryzuje (po podaniu jednorazowym)

znacznie wyższe powinowactwo do podtypu α_{1A} , wykazując tym samym słabsze działanie względem podtypów α_{1B} i α_{1D} [Nojimoto et al., 2010, Proudman et al., 2020], a ponadto w politerapii depresji znajduje zastosowanie breksipirazol, którego jednym z działań receptorowych jest antagonizm względem α_{1B} -AR [Ma et al., 2017, Al Shirawi et al., 2017]. W tym miejscu warto przypomnieć, że u myszy nadekspresja podtypu α_{1B} prowadzi do progresywnej degeneracji neuronów, podczas gdy nadekspresja podtypu α_{1A} pozytywnie wpływa na funkcje poznawcze i procesy neurogenezy, a zwierzęta te w testach behawioralnych wykazują fenotyp przeciwdepresyjny (Rozdział 1.1.4). Co więcej, z α_{1A} -AR mogą bezpośrednio oddziaływać jony cynku i miedzi (z powinowactwem w zakresie ich stężeń fizjologicznych), a poziomy tych pierwiastków w surowicy są zaburzone u pacjentów chorujących na depresję [Ciolek et al., 2011].

W świetle powyższych informacji próby funkcjonalnego zróżnicowania podtypów α_1 -AR w działaniu LPD wydają się być wysoce uzasadnione, a ich wyniki potencjalnie zapewniać wiele korzyści. Można przypuszczać, że efekty danego LPD są zależne od podtypów α_1 -AR, na które wpływa, od charakteru tego oddziaływania i od zmian wywołanych w wewnątrzkomórkowych szlakach przekazywania sygnału związanych z α_1 -AR. Obserwacje i wnioski wyciągnięte z takiej analizy mogłyby rozjaśnić obraz dotychczasowych badań nad efektami przeciwdepresyjnymi i działaniami niepożądanymi obecnych LPD, posłużyć do przewidywania potencjału terapeutycznego nowych LPD i być może opracowania leków o zwiększonej specyficzności względem podtypu α_1 -AR. Badania te wpisują się również w aktualne trendy badawcze, które podkreślają znaczenie receptorów metabotropowych jako celów nowych strategii farmakologicznych leczenia zaburzeń depresyjnych [Senese et al., 2018, Jarończyk and Walory, 2022]. Ponadto, historia farmakologii obfituje w takie odkrycia jak koncepcja Raymonda Ahlquista, który zaproponował rozróżnienie AR na podtypy α i β wykazujące odmienne efekty aktywacji w wyniku działania tego samego liganda. Odkrycia te otworzyły drogę do wielu dalszych badań z różnych dziedzin nauki, co tym bardziej skłania do rozważenia funkcjonalnego zróżnicowania podtypów α_1 -AR w kontekście działania LPD.

Rozdział 2

Cele pracy

Głównym celem rozprawy było zbadanie, czy funkcjonalny udział α_1 -AR w efektach indukowanych przez LPD jest zróżnicowany w zależności od podtypu α_1 -AR. Cel ten realizowano w oparciu o badania przeprowadzone w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo*, poprzez następujące cele szczegółowe.

1. Wykorzystując trzy linie komórkowe ze stabilną ekspresją pojedynczego podtypu α_1 -AR (α_1 A-AR, α_1 B-AR i α_1 D-AR), określenie czy i w jaki sposób LPD z różnych grup wpływają na indukowaną przez agonistę aktywację poszczególnych podtypów α_1 -AR, z uwzględnieniem krótkotrwałego i długotrwałego oddziaływania LPD na receptor.
2. Wykorzystując mysią linię transgeniczną typu potrójny knockout z unieczynnieniem genów kodujących wszystkie trzy podtypy α_1 -AR (ABD-KO), ocenienie wpływu mutacji na gęstość receptorów adrenergicznych α_1 , α_2 i β w mózgu na podstawie badań autoradiograficznych.
3. Wykorzystując trzy mysie linie transgeniczne typu knockout z selektywnym unieczynnieniem genu kodującego pojedynczy podtyp α_1 -AR (A-KO, B-KO i D-KO), ocenienie wpływu mutacji na tkankowe poziomy neurotransmiterów monoaminergicznych i ekspresję białek apoptotycznych.
4. Wykorzystując trzy mysie linie transgeniczne typu knockout z selektywnym unieczynnieniem genu kodującego pojedynczy podtyp α_1 -AR (A-KO, B-KO i D-KO), określenie czy i w jaki sposób dana mutacja wpływa na efekty długotrwałego stosowania dezipraminy i milnacipranu w mózgu samców i

samic na różnych poziomach molekularnych, na podstawie badań ekspresji mRNA podtypów α_1 -AR, profilowania ekspresji genów, ekspresji i aktywacji wybranych białek sygnałowych oraz poziomów wybranych pierwiastków.

5. Pogłębienie wiedzy na temat roli podtypów α_1 -AR w efektach działania LPD, w kontekście potencjalnego rozwoju nowych strategii farmakoterapii depresji.

Rozdział 3

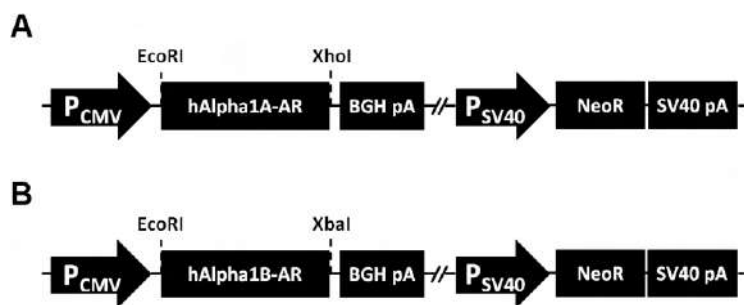
Materiały i metody

3.1 Modele *in vitro* - linie komórkowe

3.1.1 Hodowle komórkowe i transfekcja

Komórki PC12 (DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Leibniz Institute, Niemcy), wywodzące się z guza chromochłonnego nadnerczy szczura, hodowano w medium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) zawierającym 10% surowicę końską (PAA Laboratories, Niemcy), 5% płodową surowicę bydlęcą (PAA Laboratories, Niemcy), 10 mg/ml streptomycynę (Sigma-Aldrich, USA) i 100 U/ml penicylinę (Sigma-Aldrich, USA). Hodowle komórkowe prowadzono, zgodnie z zaleceniami repozytorium DSMZ, na szalkach hodowlanych pokrytych kolagenem typu I (Corning, USA) w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂. Komórki PC12 poddano transfekcji z użyciem lipofektaminy 2000 (Invitrogen, USA) i plazmidu pcDNA3.1(+) zawierającego gen kodujący ludzki α_{1A} -AR (AR0A1A0001) lub α_{1B} -AR (AR0A1B0000) (cDNA Resource Center, Missouri S&T, USA) (Rycina 3.1). Komórki wykazujące stabilną transfekcję wyselekcjonowano na podstawie wzrostu w obecności 500 μ g/ml antybiotyku G418 (Sigma-Aldrich, USA) oraz oceny funkcjonalnej aktywności receptorów α_{1A} -AR i α_{1B} -AR opisanej w Rozdziale 3.1.1.1.

W badaniach wykorzystano również linię komórkową ChemiSCREENTM Ready-to-AssayTM α_{1D} Adrenergic Family Receptor Frozen Cells (Sigma-Aldrich, USA), która charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji ludzkiego α_{1D} -AR na po-



Rycina 3.1: Kasety ekspresyjne plazmidów użytych do transfekcji, zawierających gen kodujący ludzki α_{1A} -AR (A) lub α_{1B} -AR (B). EcoRI, XhoI, XbaI - miejsca cięć enzymów restrykcyjnych, P_{CMV} – promotor ludzkiego wirusa cytomegalii, hAlpha1A-AR - ludzki α_{1A} -AR, hAlpha1B-AR - ludzki α_{1B} -AR, BGH pA – sygnał poliadenylacji z genu kodującego bydlęcy hormon wzrostu, P_{SV40} – promotor małpiego wirusa SV40, NeoR – gen oporności na neomycynę, SV40 pA – sygnał poliadenylacji z wirusa SV40.

wierzchni komórek i została stworzona ze szczególnym przeznaczeniem do oznaczeń jonów wapnia uwalnianych w odpowiedzi na stymulację tego receptora. Komórki te hodowano w medium DMEM (Gibco, USA) zawierającym 10% płodową surowicę bydlęcą (PAA Laboratories, Niemcy).

Hodowla genetycznie zmodyfikowanych linii komórkowych i ich użycie w celach badawczych zostały zatwierdzone przez Ministra Klimatu i Środowiska (Decyzja nr 28/2015, Decyzja nr 49/2021).

Tabela 3.1: Linie komórkowe wykorzystane w badaniach *in vitro*

Nazwa	Charakterystyka	Źródło
α_{1A} -AR	komórki PC12 ze stabilną ekspresją α_{1A} -AR	transfekcja
α_{1B} -AR	komórki PC12 ze stabilną ekspresją α_{1B} -AR	transfekcja
α_{1D} -AR	ChemiSCREEN TM Ready-to-Assay TM α_{1D} Adrenergic Family Receptor Frozen Cells	Sigma-Aldrich, USA

3.1.1.1 Ocena funkcjonalności linii komórkowych ze stabilną ekspresją α_{1A} -AR i α_{1B} -AR

Odpowiedź komórek na stymulację receptorów α_{1A} -AR i α_{1B} -AR wywołaną działaniem agonistów, noradrenaliny (Sigma-Aldrich, USA) i fenylefryny (Sigma-Aldrich, USA), oceniano na podstawie pomiaru akumulacji fosforanu inozytolu (IP). Pomiar wykonano zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.1.2.1, a z krzywej zależności stężenia IP od stężeń agonisty wyznaczono wartości EC_{50} . Podobnie zbadano odpowiedź komórek na stymulację receptorów α_{1A} -AR i α_{1B} -AR wywołaną działaniem noradrenaliny po wcześniejszej ekspozycji na działanie antagonistów, prazosyny (Sigma-Aldrich, USA) i WB4101 (Sigma-Aldrich, USA). Pomiar wykonano zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.1.2.1, jednak w tym przypadku do buforu stymulującego dodano prazosynę lub WB4101 w zakresie stężeń od $4 \cdot 10^{-10}$ M do $4 \cdot 10^{-4}$ M, a następnie po 5 min dodano noradrenalinę, której końcowe stężenie odpowiadało wartości EC_{90} i wynosiło $4 \mu\text{M}$. Wyniki przedstawiono jako procent maksymalnej odpowiedzi na stymulację, a z krzywej zależności od stężeń antagonisty wyznaczono wartości IC_{50} .

W celu oceny wpływu transfekcji i użyteczności komórek ze stabilną ekspresją α_{1A} -AR i α_{1B} -AR do dalszych eksperymentów, zbadano ich aktywność metaboliczną zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.1.3.

3.1.2 Ocena aktywacji α_1 -AR na podstawie pomiaru akumulacji wtórnych przekazników

3.1.2.1 Pomiar akumulacji fosforanu inozytolu (IP)

Do pomiaru akumulacji fosforanu inozytolu (IP) wykorzystano zestaw IP-One HTRF assay kit (Cisbio, USA). Komórki α_{1A} -AR i α_{1B} -AR oddzielono od podłoża hodowlanego za pomocą roztworu nieenzymatycznego odczynnika Versene (Gibco, USA) w PBS sporządzonego w stosunku 1:1. Komórki odwirowano (5 min, $200 \times g$) i zawieszono w buforze stymulującym składającym się z 10 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 4,2 mM KCl, 146 mM NaCl, 5,5 mM glukozy, 50 mM LiCl, pH 7. Następnie komórki wysiano na płytkę 384-dołkową w ilości 14 000 komórek/ $7 \mu\text{l}$ bufora stymulującego/dołek. Kolejne kroki wykonano zgod-

nie z protokołem producenta zestawu. Komórki stymulowano poprzez ekspozycję na działanie noradrenaliny lub fenylefryny w zakresie stężeń 10^{-9} M do 10^{-3} M. Po 75 min inkubacji w temperaturze 37°C do komórek dodano odczynnik detekcyjny i inkubowano jeszcze przez 2 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wykonano pomiar fluorescencji wykorzystując funkcję odczytu z opóźnieniem czasowym (TRF, fluorescencja czasowo-rozdzielcza). Fluorescencję wzbudzano światłem o długości fali 620 nm, a jej emisję rejestrowano przy długości fali 655 nm. Stężenie IP obliczono zgodnie z protokołem producenta zestawu.

3.1.2.2 Pomiar akumulacji jonów wapnia (Ca^{2+})

Do pomiaru akumulacji jonów wapnia (Ca^{2+}) wykorzystano zestaw Fluo-4 DirectTM calcium assay kit (Invitrogen, USA). Komórki ChemiSCREENTM Ready-to-AssayTM α_{1D} oddzielono od podłoża hodowlanego za pomocą roztworu trypsyiny z EDTA (Gibco, USA), odwirowano (5 min, $200 \times g$) i zawieszono w buforze składającym się z 30 ml 1 M HEPES w 1,47 l 1x HBSS pH 7,3. Komórki wysiano na płytkę 384-dołkową w ilości 17 000 komórek/5 μl buforu stymulującego/dołek. Kolejne kroki wykonano zgodnie z protokołem producenta zestawu. Komórki stymulowano poprzez ekspozycję na działanie noradrenaliny, której końcowe stężenie odpowiadało wartości EC_{90} i wynosiło 1 μM . Po 5 min inkubacji w temperaturze 37°C do komórek dodano odczynnik 2X Fluo-4 DirectTM calcium reagent loading solution (Invitrogen, USA) i inkubowano jeszcze przez 30 min w temperaturze 37°C , a następnie 1 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wykonano pomiar fluorescencji, którą wzbudzano światłem o długości fali 494 nm, a jej emisję rejestrowano przy długości fali 516 nm. Stężenie jonów wapnia obliczono zgodnie z protokołem producenta zestawu.

3.1.3 Ocena aktywności metabolicznej komórek - metoda redukcji resazuryny

Aktywność metaboliczną komórek oceniano na podstawie ich zdolności redukcji resazuryny do resorufiny. Do hodowli komórkowych dodano 0,44 mM roztwór resazuryny (Sigma-Aldrich, USA) w PBS (phosphate buffered saline). Komórki inkubowano przez 1h w temperaturze 37°C , a następnie wykonano pomiar fluore-

scencji resorufiny w spektrofлуorymetrze Synergy Mx (BioTek Instruments, USA) z wykorzystaniem programu Gen 5 (BioTek Instruments, USA). Fluorescencję wzbudzano światłem o długości fali 540 nm, a jej emisję rejestrowano przy długości fali 590 nm.

3.1.4 Badanie gęstości podtypów α_1 -AR na powierzchni komórek - analiza saturacyjna wiązania [^3H]-prazosyny

W celu zbadania gęstości receptorów α_1 -AR i oceny parametrów wiązania wyznaczono liczbę miejsc wiążących przypadających na komórkę wykorzystując metodę analizy saturacyjnej przy użyciu znakowanego antagonisty [^3H]-prazosyny (PerkinElmer, USA). Komórki PC12 ze stabilną funkcjonalną ekspresją α_{1A} -AR i α_{1B} -AR oraz komórki ChemiSCREENTM Ready-to-AssayTM α_{1D} zawieszono w buforze 50 mM Tris-HCl pH 7,4, a następnie poddano homogenizacji w homogenizatorze tkankowym Polytron i wirowaniu (45 min, $35\,000 \times g$, 4°C). Otrzymany pelet poddano ponownej procedurze homogenizacji i wirowaniu. Następnie tak uzyskany pelet zawieszono w buforze 50 mM Tris-HCl pH 7,4 i zamrożono w -80°C. W celu wyznaczenia całkowitego wiązania zastosowano różne stężenia radioliganda. Do oznaczeń mieszało: 25 μl buforu składającego się z 20 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgCl_2 , 1mM EDTA, pH 7,4, 25 μl [^3H]-prazosyna w zakresie stężeń od 0,125 nM do 16 nM oraz 150 μl rozpuszczonego peletu. Oznaczono również wiązanie niespecyficzne, przy stałym stężeniu nieznakowanego liganda wysycającego miejsca niespecyficznego łączenia się radioliganda do receptora. W tym przypadku bufor w mieszaninie zastąpiono 25 μl 10 μM prazosyny. Po 1 h inkubacji z wytrząsaniem w 37°C sondy zebrano na 96-dołkowe płytki z filtrami GF/B (PerkinElmer, USA) i 4-krotnie przepłukano. Następnie po całonocnej inkubacji w ciemności dodano 35 μl płynu scyntylacyjnego Ultima Gold LSC Cocktail (Sigma-Aldrich, USA) i wykonano pomiar luminescencji z wykorzystaniem aparatu MicroBeta TriLux (PerkinElmer, USA). Stężenie białka w roztworze peletu oznaczono za pomocą metody Lowry'ego i przeliczono na liczbę komórek z eksperymentalnie wyznaczonej zależności 1,1 mln komórek - 0,25 mg białka. Specyficzne wiązanie wyznaczono przez odjęcie sygnału niespecyficznego (czyli w obecności nieznakowanej prazosyny) od sygna-

łu całkowitego (czyli przy braku obecności nieznakowanej prazosyny) w przeliczeniu na 1 mg białka. Z krzywych wiązania specyficznego wyznaczono parametry stałej dysocjacji (K_d) i maksymalną liczbę miejsc wiążących (B_{max}).

3.1.5 Ocena wpływu leków przeciwdepresyjnych na aktywację podtypów α_1 -AR wywołaną obecnością agonisty

W celu zbadania wpływu LPD na aktywację α_1 -AR, komórki inkubowano przez 10 min z LPD (Tabela 3.2) w zakresie stężeń od 10^{-10} M do 10^{-4} M, przy czym po 5 min dodawano noradrenalinę, której końcowe stężenie odpowiadało wartości EC_{90} i wynosiło $4 \mu\text{M}$ dla α_{1A} -AR i α_{1B} -AR lub $1 \mu\text{M}$ dla α_{1D} -AR. Następnie dodawano właściwy odczynnik detekcyjny i po upływie 75 min lub 95 min, odpowiednio dla pomiaru IP i Ca^{2+} , zmierzono akumulację tych wtórnych przekazników (zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.1.2). Z krzywych zależności stężenia wtórnych przekazników od stężenia LPD wyznaczono wartości IC_{50} . Aktywność metaboliczną komórek po 30 min preinkubacji z LPD oceniono na podstawie ich zdolności redukcji resazuryny do resorufiny (zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.1.3).

Tabela 3.2: Leki przeciwdepresyjne wykorzystane w badaniach *in vitro*

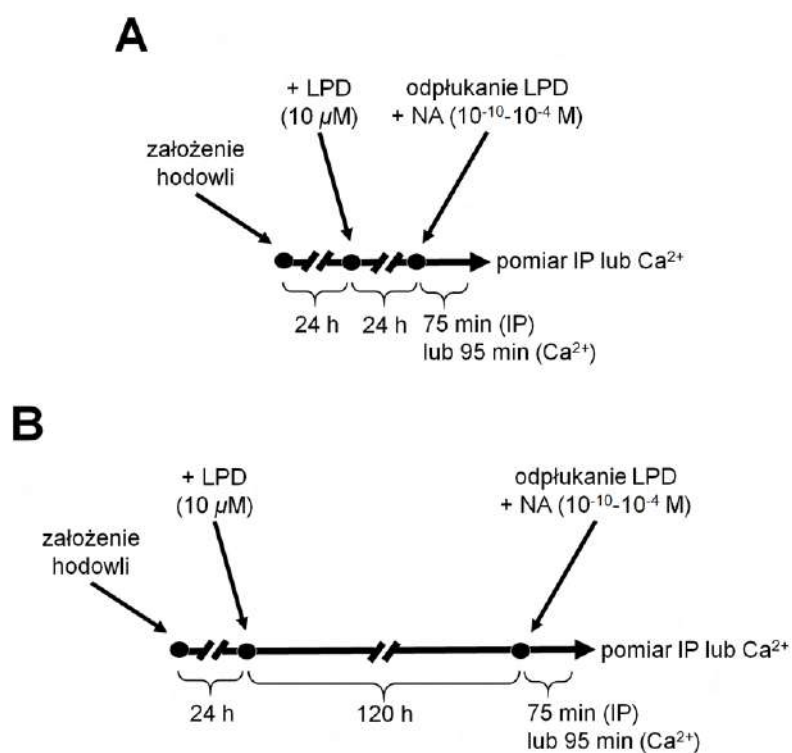
Skrót	Nazwa	Źródło (nr katalogowy)
IMI	imipramina	Sigma-Aldrich, USA (I7379)
DMI	dezipramina	Sigma-Aldrich, USA (D3900)
CIT	citalopram	Sigma-Aldrich, USA (C7861)
FLU	fluoksetyna	Tocris Bioscience, UK (0927)
REB	reboksetyna	Tocris Bioscience, UK (1982)
MIA	mianseryna	Sigma-Aldrich, USA (M2525)

3.1.6 Ocena wpływu 24 h i 120 h inkubacji z lekami przeciw-depresyjnymi na aktywację podtypów α_1 -AR wywołaną obecnością agonisty

W celu zbadania wpływu przedłużonej ekspozycji na działanie LPD na aktywację α_1 -AR, komórki inkubowano przez 24 h i 120 h w stałym 10 μ M stężeniu LPD (Tabela 3.2). Po odpłukaniu komórki inkubowano z noradrenaliną w zakresie stężeń od 10^{-10} M do 10^{-4} M. Następnie po upływie 75 min lub 95 min, odpowiednio dla pomiaru IP i Ca^{2+} , zmierzono akumulację tych wtórnych przekazników (zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.1.2). Z krzywych zależności stężenia wtórnych przekazników od stężenia agonisty wyznaczono wartości EC_{50} . Aktywność metaboliczną komórek po 24 h i 120 h preinkubacji z LPD oceniono na podstawie ich zdolności redukcji resazuryny do resorufiny (zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.1.3).

3.1.7 Analiza danych

Do obliczeń i wizualizacji danych, jeśli nie napisano inaczej, wykorzystano programy Microsoft Excel 2016 i 2019 (Microsoft, USA) oraz Prism 5.0 i 9.0 (GraphPad, USA). Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono stosując narzędzia programu Statistica 10 (StatSoft, USA). Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanych metod statystycznych zamieszczono pod rycinami i tabelami.



Rycina 3.2: Schemat przebiegu eksperymentu oceniającego wpływ 24 h (**A**) i 120 h (**B**) inkubacji komórek z lekiem przeciwdepresyjnym (LPD) na poziom aktywacji receptorów α_1 -adrenergicznych wywołany obecnością noradrenaliny (NA), oceniany na podstawie akumulacji fosforanu inozytolu (IP) lub jonów wapnia (Ca^{2+}).

3.2 Modele *in vivo* - mysie linie transgeniczne

3.2.1 Hodowla zwierząt i genotypowanie

Doświadczenia przeprowadzono na samcach i samicach myszy trzech linii transgenicznych typu knockout (KO), z selektywnym unieczynnieniem α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO) oraz osobnikach typu dzikiego (WT) szczepu C57Bl6/J (Charles River, Niemcy). Początkowo planowano wykonanie badań na myszach KO z unieczynnieniem wszystkich trzech podtypów α_1 -AR (ABD-KO), które sprowadzono w ramach zagranicznej współpracy z prof. Ian McGrath i dr. Craig Daly (Univeristy of Glasgow, UK). Niestety z uwagi na obniżoną płodność charakterystyczną dla tej linii transgenicznej oraz trudności w utrzymaniu miotów wynikających z adaptacji zwierząt do nowego środowiska, nie udało się wygenerować wystarczająco licznej grupy zwierząt. Zdecydowano przeprowadzić badania na liniach z pojedynczą mutacją (A-KO, B-KO, D-KO), które wyprowadzono z linii ABD-KO poprzez krzyżowanie wsteczne (ang. *backcross*) z osobnikami WT szczepu C57Bl6/J, będących oryginalnym tłem genetycznym tej linii transgenicznej. W wyniku krzyżówek wstecznych otrzymano heterozygoty linii z pojedynczą mutacją, które następnie krzyżowano ze sobą dla uzyskania homozygot z genem kodującym odpowiedni podtyp α_1 -AR na obu allelach.

Hodowlę zwierząt prowadzono w standardowych warunkach bytowych, tj. temperaturze 23-24°C, wilgotności 35-45%, z zachowaniem naturalnego 24-godzinnego cyklu dobowego (jasna faza 6:00-18:00). Przez cały okres trwania eksperymentu zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i pożywienia. Zwierzęta dekapitowano w wieku ok. 12 tygodni, podczas jasnej fazy cyklu dobowego. Rodzaj izolowanego materiału i sposób jego przechowywania uzależniono od zaplanowanych analiz biochemicznych:

- do badań autoradiograficznych wyizolowano mózg w całości, utrwalono go w heksanie (Avantor Performance Materials, Polska), a następnie zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C (Rozdział 3.2.2),
- do badań chromatograficznych wyizolowano podwzgórze (HY), które zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C (Rozdział 3.2.3),

- do badań na poziomie RNA wyizolowano korę przedczołową (PFC) i hipokamp (HIP) z jednej półkuli mózgowej, które umieszczono w odczynniku stabilizującym RNAlater (Thermo Scientific, USA) i przechowywano w -20°C (Rozdział 3.2.6, Rozdział 3.2.7),
- do badań na poziomie białek wyizolowano korę przedczołową (PFC) i hipokamp (HIP) z jednej półkuli mózgowej, które zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C (Rozdział 3.2.4, Rozdział 3.2.8),
- do badań spektrometrycznych wyizolowano wzgórze (TH), które zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C (Rozdział 3.2.9).

Hodowla mysich linii transgeniczných prowadzona była w oparciu o zgodę na zamknięte użycie GMO klasy I uzyskaną z Ministerstwa Środowiska (Decyzja nr 59/2013, Decyzja nr 161/2018), a procedury wykonane na zwierzętach przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej przy Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk (Uchwała nr 1233/2015).

3.2.1.1 Genotypowanie

Genotyp myszy określano około 3-4 tygodnie po urodzeniu i dodatkowo weryfikowano w grupach zwierząt eksperymentalnych po ich uśmierceniu. W tym celu wykonywano biopsję małych fragmentów ucha lub ogona (do 1 mm), z których izolowano genomowe DNA przy użyciu zestawu AccuStart II PCR Genotyping Kit (Quantabio, USA) zgodnie z protokołem producenta. Próbkę inkubowano z odczynnikiem ekstrahującym w 95°C przez 30 min, a następnie dodawano bufor stabilizujący w stosunku objętościowym 1:1. Z uzyskanego lizatu pobierano $2\mu\text{l}$ stanowiące matrycę do reakcji PCR, którą przeprowadzano z wykorzystaniem odczynnika ReddyMix PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA), przygotowując mieszaniny reakcyjne zgodnie z protokołem zamieszczonym w Tabeli 3.3. Wszystkie startery użyte do sprawdzenia genotypu myszy zakupiono w Sigma-Aldrich (USA), a ich sekwencje nukleotydowe przedstawiono w Tabeli 3.4. Mieszaniny reakcyjne inkubowano w termocyklerze T100 (Bio-Rad, USA) i amplifikowano zgodnie z profilem temperaturowym zamieszczonym w Tabeli 3.5. Produkty reakcji poddawano rozdzielowi w 2% żelu agarozowym z dodatkiem znacznika fluorescencyjnego Midori Green (Nippon Genetics, Niemcy), stanowiącego alternatywę

dla tradycyjnie używanego w tym celu mutagennego bromku etydy, a następnie wizualizowano przy użyciu czytnika UV E-Box (Vilber, Francja).

Tabela 3.3: Skład mieszanin PCR w procesie genotypowania myszy.

Odczynnik	Objętość
ReddyMix PCR Master Mix (2x)	10 μ l
Starter 1 (5 μ M)	0,5 μ l
Starter 2 (5 μ M)	0,5 μ l
DNA	2,0 μ l
Woda wolna od nukleaz	do 20 μ l
lub	
ReddyMix PCR Master Mix (2x)	10 μ l
Starter 1 (5 μ M)	1,5 μ l
Starter 2 (5 μ M)	1,0 μ l
Starter 3 (5 μ M)	1,0 μ l
DNA	2,0 μ l
Woda wolna od nukleaz	do 20 μ l

Liczba starterów użytych w reakcji jest uzależniona od sposobu ich zaprojektowania.

Tabela 3.4: Sekwencje starterów użytych w procesie genotypowania myszy.

Linia transgeniczna	Nazwy starterów	Sekwencje 5'–3'
A-KO	A1A5'	AGCTAACCATTTCAGCAAAGAC
	A1A3'1A	CAAGATCACCCCAAGTAGAATG
	A1A3'LACZ	TAACCGTGCATCTGCCAGTTTG
B-KO	NEO1A1B	ATTTGTCACGTCCTGCACGAC
	ADRA1B2022R	CCTGCAGGTATGAGGTCTGTG
	ADRA1B1595F	CCAAAATGCTCCCAACTCTG
D-KO	NEO2373F	CTTTGTTAAGAAGGGTGAGAA CAGAG
	ADRA1D293R	GCTAGGAAGACACCCACTCC
	ADRA1D013F	GACATCCTGAGCGTCACTTTC

Tabela 3.5: Parametry reakcji PCR w procesie genotypowania myszy.

Etap reakcji	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	94°C	2 min 30 s	1
Denaturacja	94°C	45 s	35
Przyłączanie starterów	60°C	45 s	
Elongacja	72°C	45 s	
Końcowa elongacja	72°C	10 min	1
	4°C	∞	

3.2.2 Badanie gęstości receptorów α_1 -AR, α_2 -AR i β -AR w mózgu metodą autoradiografii

W celu zbadania gęstości receptorów α_1 -AR, α_2 -AR i β -AR utrwalony w heksanie i zamrożony mózg samca ABD-KO skrojono w płaszczyźnie czołowej na kriostacie Jung C 3000 (Leica, Niemcy) w temperaturze -20°C na skrawki grubości $12\ \mu\text{m}$. Skrawki mózgu odpowiadające przekrojom na poziomie $+1,70\ \text{mm}$ i $-1,34\ \text{mm}$ od punktu bregma nałożono na szkiełka podstawowe pokryte żelatyną (Sigma, Niemcy) i przechowywano w temperaturze -80°C . W dniu eksperymentu skrawki na szkiełkach doprowadzono do temperatury pokojowej i poddano inkubacji z wybranymi radioligandami α_1 -AR, α_2 -AR i β -AR zgodnie z opisanymi wcześniej protokołami [Kusmider et al., 2020, Dziedzicka-Wasylewska et al., 2006, Nalepa et al., 2005, Faron-Górecka et al., 2004]. W tym celu skrawki na szkiełkach umieszczono w buforze, którego skład i czas inkubacji były zależne od rodzaju badanego receptora (Tabela 3.6). Następnie wysuszono je strumieniem zimnego powietrza i poddano inkubacji z odpowiednim radioligandem przez 1 h w temperaturze pokojowej. By oznaczyć wiązanie niespecyficzne, część skrawków inkubowano dodatkowo z nieznakowanym ligandem przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie skrawki płukano w buforze schłodzonym do 4°C , wysuszono strumieniem zimnego powietrza i pozostawiano do całkowitego wyschnięcia. Tak przygotowane preparaty umieszczono w kasetach radiologicznych zawierających ekrany Fujibas TR2024 (Fujifilm, Japonia) i trytowane skale autoradiograficzne (Amersham, USA) umożliwiające precyzyjne określenie aktywności związanych radioligandów. Po 10 dniach wykonano digitalizację obrazów preparatów z wykorzystaniem aparatu BAS-5000 (Fujifilm, Japonia). Gęstość optyczną sygnału analizowano przy użyciu oprogramowania Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Japonia). Na podstawie skali autoradiograficznej wyznaczono krzywe kalibracyjne zależności gęstości optycznej od radioaktywności danego radioliganda, które wraz z aktywnością specyficzną danego radioliganda wykorzystano do przeliczenia gęstości optycznej otrzymanych autoradiogramów na liczbę moli związanego radioliganda w przeliczeniu na 1 mg tkanki. Identyfikację struktur mózgowych przeprowadzono na podstawie atlasu anatomicznego mózgu myszy [Paxinos and Franklin, 2001].

Tabela 3.6: Odczynniki wykorzystane w badaniach autoradiograficznych

Rodzaj receptora	Odczynniki
α_1 -AR	Skład buforu: 10 mM Na_2HPO_4, 119 mM NaCl, 6mM KCl, 1,2 mM MgSO_4, 1,3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,8 (czas inkubacji: 60 min) Radioligand: 0,9 nM [^3H]-prazosyna (Perkin Elmer, USA) Aktywność specyficzna radioliganda: 85 Ci/mmol Nieznakowany ligand: 10 μM WB4101 (Sigma-Aldrich, USA)
α_2 -AR	Skład buforu: 50 mM bufor fosforanowy, pH 7,4 (czas inkubacji: 15 min) Radioligand: 0,5 nM [^3H]-RX821002 (NEN Life Science Products, USA) Aktywność specyficzna radioliganda: 63,8 Ci/mmol Nieznakowany ligand: 5 μM RX 821002 (Sigma-Aldrich, USA)
β -AR	Skład buforu: 50mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5mM KCl, pH 7,4 (czas inkubacji: 15 min) Radioligand: 4 nM [^3H]-CGP12177 (NEN Life Science Products, USA) Aktywność specyficzna radioliganda: 37,7 Ci/mmol Nieznakowany ligand: 10 μM propranolol (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.3 Oznaczenie poziomów wybranych neuroprzekaźników i ich metabolitów metodą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej

Poziom tkankowy noradrenaliny (NA), dopaminy (DA), jej metabolitów kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC) i kwasu homowanilinego (HVA) oraz serotoniny (5-HT) wraz z jej metabolitem kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w HY myszy zbadano przy użyciu ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC, ang. *ultra-high performance liquid chromatography*) z detekcją kulochemiczną, opisaną wcześniej metodą z drobnymi modyfikacjami [Haduch et al., 2016, Haduch et al., 2022]. Oznaczenia te wykonano w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.

Próbki tkanek homogenizowano poprzez sonifikację w 20 objętościach (v/w) schłodzonego 0,1 M kwasu nadchlorowego (HClO_4) i odwirowano (15 min, $15\,000 \times g$, 4°C). Otrzymane supernatanty przeniesiono do nowych probówek, odwirowano (5 min, $15\,000 \times g$, 4°C) i przesączono przez filtr membranowy $0,2\,\mu\text{m}$. Tak przygotowane próbki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonywania dalszej analizy. Następnie, $10\,\mu\text{l}$ próbki wstrzykiwano do systemu UHPLC Ultimate 3000 Dionex (Thermo Scientific, Niemcy). Zastosowany system składał się z detektora elektrochemicznego ECD-3000RS, ultrakulometrycznej celki analitycznej 6011RS, autosamplera WPS-3000RS i kolumny analitycznej Hypersil Gold $3\,\mu\text{m}$, $100 \times 3\,\text{mm}$ (Thermo Scientific, USA). Neuroprzekaźniki i ich metabolity eluowano za pomocą fazy ruchomej ($0,1\,\text{M}\,\text{KH}_2\text{PO}_4$, $0,5\,\text{mM}\,\text{EDTA}$, $80\,\text{mg/l}$ 1-oktanosulfonianu sodu, 4% metanolu, $\text{pH}\,4,0$) przy szybkości przepływu $0,6\,\text{ml/min}$ i temperaturze kolumny 30°C . Potencjały ogniwa kulometrycznego wynosiły: $E_1 = -50\,\text{mV}$, $E_2 = +350\,\text{mV}$ [Haduch et al., 2022]. Piki chromatograficzne identyfikowano i kwantyfikowano poprzez porównanie z pikami wzorcowymi: NA, DA, DOPAC, 5-HT i 5-HIAA, (Sigma-Aldrich, USA) w stężeniu $50\,\text{ng/ml}$ oraz HVA (Sigma-Aldrich, USA) w stężeniu $100\,\text{ng/ml}$ [Haduch et al., 2016]. Dane opracowano przy użyciu oprogramowania Chromoleon 7 (Thermo Scientific, USA) [Haduch et al., 2022]. Granica wykrywalności NA, DA, DOPAC, HVA i 5-HIAA wynosiła $0,5\,\text{pg}/10\,\mu\text{l}$, a 5-HT $1\,\text{pg}/10\,\mu\text{l}$.

3.2.4 Oznaczenie ekspresji białek apoptotycznych - macierze białkowe

3.2.4.1 Izolacja i oznaczenie stężenia białka

Analizę ekspresji białek apoptotycznych wykonano na próbkach całkowitego białka wyizolowanego z HIP samic. Zamrożone tkanki poddano homogenizacji na lodzie z wykorzystaniem RIPA Lysis Buffer (Sigma-Aldrich, USA) oraz inhibitorów 1:100 v/v cOmpleteTM Mini Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, USA) i 1:100 v/v HaltTM Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific, USA). Do izolacji białka z PFC stosowano 300 μ l buforu mieszaniny lizującej, a w przypadku HIP – 200 μ l. Próbkę homogenizowano za pomocą kulek ze stali nierdzewnej i urządzenia TissueLyser II (Qiagen, USA), dwukrotnie po 3 min przy częstotliwości 30 Hz. Następnie próbki inkubowano przez 1h na lodzie, zwirowano (20 min, 18 000 $\times$ g, 4°C) i zebrano supernatant. Całkowite stężenie białka oznaczono za pomocą metody kolorymetrycznej wykorzystując zestaw Bicinchonic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, USA). Absorbancję mierzono przy długości fali 562 nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek SynergyTM Mx Microplate Reader (BioTek, USA). Próbkę wyizolowanego białka przechowywano w -80°C.

3.2.4.2 Wiązanie z przeciwciałami na membranie i immunodetekcja

Ekspresję białek apoptotycznych oznaczono za pomocą zestawu Proteome Profiler Mouse Apoptosis Array Kit (Bio-Techne, USA) zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, membrany blokowano w odczynniku Array Buffer 1 na wytrząsarce laboratoryjnej przez 1h w temperaturze pokojowej. W tym czasie przygotowano próbki poprzez zmieszanie objętości wyizolowanego białka odpowiadającej 400 μ g z odczynnikiem Lysis Buffer 17 do objętości 170 μ l i dodanie 830 μ l odczynnika Array Buffer 1 (do końcowej objętości 1 ml). Próbkę naniesiono na oddzielne membrany w oddzielnych pojemnikach i inkubowano przez noc na wytrząsarce laboratoryjnej w 4°C. Następnie membrany płukano w odczynniku Wash Buffer, inkubowano z odczynnikiem Detection Antibody Cocktail na wytrząsarce laboratoryjnej przez 1 h w temperaturze pokojowej i ponownie płukano w odczynniku Wash Buffer. Membrany inkubowano z peroksydazą chrzanową sprzężoną ze streptawidyną na wytrząsarce laboratoryjnej przez 30 min w tempe-

raturze pokojowej. Po kolejnej serii płukań w odczynniku Wash Buffer, membrany inkubowano przez 5 min z odczynnikiem Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA). Detekcję sygnału mierzono z wykorzystaniem systemu obrazowania PXi4 i oprogramowania GeneSys (Syngene, UK). Poziom sygnału oceniano za pomocą analizy gęstości optycznej otrzymanych prążków z wykorzystaniem programu Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Japonia).

3.2.5 Podawanie leków przeciwdepresyjnych

Zwierzętom podawano lek przeciwdepresyjny, 20 mg/kg chlorowodorek dezipraminy (DMI) (Sigma-Aldrich, USA) lub 30 mg/kg chlorowodorek milnacipranu (MIL) (Biosynth Carbosynth, USA), w formie iniekcji dootrzewnowej (*i.p.*) raz dziennie przez 21 kolejnych dni. Osobnikom kontrolnym podawano iniekcje rozpuszczalnika, tj. roztworu soli fizjologicznej 0,9% NaCl (sal) (Polpharma, Polska). Podział na grupy eksperymentalne i liczebność zwierząt w poszczególnych grupach zamieszczono w Tabeli 3.7.

Tabela 3.7: Liczebność grup zwierząt eksperymentalnych z poszczególnych linii transgenicznych.

Genotyp	SAMCE			SAMICE		
	sal	DMI	MIL	sal	DMI	MIL
A-KO	8	8	8	8	8	8
WT	8	8	8	8	8	8
B-KO	8	8	8	8	8	8
WT	8	8	7	8	8	8
D-KO	8	8	8	8	8	8
WT	8	7	8	7	8	8

3.2.6 Oznaczenie ekspresji mRNA metodą qRT-PCR

3.2.6.1 Izolacja i oznaczenie stężenia RNA

Analizę ekspresji α_{1A} -AR, α_{1B} -AR i α_{1D} -AR na poziomie mRNA wykonano na próbkach całkowitego RNA wyizolowanego z PFC samców za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, tkanki poddano homogenizacji w buforze RLT z dodatkiem 2-merkaptoetanolu w aparacie TissueLyser II (Qiagen, USA) dwukrotnie po 3 min przy częstotliwości 30 Hz. Próbki poddano wirowaniu (3 min, $18\,000 \times g$), a otrzymany supernatant zmieszano w stosunku objętościowym 1:1 z 70% etanolem i poddano wiązaniu z membraną RNeasy w kolumnie do wirowania. Po dwuetapowym płukaniu RNA eluowano ze złoża za pomocą 30 μ l wody wolnej od nukleaz. Stężenie i jakość otrzymanego RNA oceniono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem aparatu NanoPhotometer (Implen, USA).

3.2.6.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) - synteza cDNA

Wyizolowane całkowite RNA poddano reakcji PCR z odwrotną transkrypcją z wykorzystaniem zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) zgodnie z protokołem producenta. Mieszaniny reakcyjne przygotowano zgodnie z protokołem zamieszczonym w Tabeli 3.8, a następnie inkubowano w termocyklerze T100 (Bio-Rad, USA) i amplifikowano zgodnie z profilem temperaturowym zamieszczonym w Tabeli 3.9.

Tabela 3.8: Skład mieszaniny RT-PCR

Odczynnik	Objętość
RT Buffer (10x)	1,5 μ l
dNTP mix (100mM) (25x)	0,6 μ l
RT Random Primers (10x)	1,5 μ l
RNase Inhibitor	0,75 μ l
MultiScribe TM Reverse Transcriptase	0,75 μ l
RNA	= 1,5 μ g
Woda wolna od nukleaz	do 15,0 μ l

Tabela 3.9: Parametry reakcji RT-PCR

Etap reakcji	Temperatura	Czas
Wydłużanie starterów	25°C	10 min
Synteza cDNA	37°C	120 min
Deaktywacja odwrotnej transkryptazy	85°C	5 min
	4°C	∞

3.2.6.3 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Otrzymane cDNA poddano ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem odczynnika SYBR Green (A&A Biotechnology, Polska). Mieszaniny reakcyjne przygotowano zgodnie z protokołem zamieszczonym w Tabeli 3.10, a następnie nałożono, w triplikatach, do dołków na płytkach MicroAmpTM Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, USA). Sekwencje nukleotydowe użytych starterów przedstawiono w Tabeli 3.11. Tak przygotowane próbki inkubowano w aparacie QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems, USA) i amplifikowano zgodnie z profilem temperaturowym zamieszczonym w Tabeli 3.12. Wartość progową sygnału (C_T , ang. *threshold cycle*) dla każdego dołka wyznaczono automatycznie za pomocą oprogramowania QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems, USA), a otrzymane wartości normalizowano względem genów referencyjnych (*HPRT* i *Pgk1*) oraz zwierząt kontrolnych (WT sal). Poziom ekspresji genów obliczono za pomocą metody krzywej standardowej.

Tabela 3.10: Skład mieszaniny qRT-PCR

Odczynnik	Objętość
RT HS-PCR Mix SYBR	5 μ l
Starter 1	= końcowemu stężeniu (Tabela 3.11)
Starter 2	= końcowemu stężeniu (Tabela 3.11)
cDNA	= 20 ng
Woda jałowa	do 10,0 μ l

Tabela 3.11: Sekwencje starterów użytych w procesie qRT-PCR.

Gen	Sekwencje 5'–3'	Końcowe stężenie
<i>ADRA1A</i>	CTAAGGCCATTCTACTTGGGGT	50 nM
	CGAGTGCAGATGCCGATGA	50 nM
<i>ADRA1B</i>	ATTGTAGTCGGAATGTTTCATCTTA	200 nM
	GAAGTAGCCCAGCCAGAA	200 nM
<i>ADRA1D</i>	CCACTTGCTCGCCCTGTG	400 nM
	AAAGTGACGCTCAGGATGT	100 nM
<i>HPRT</i>	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	200 nM
	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG	200 nM
<i>Pgk1</i>	GTTTGGAATGGTCCTGTTGGG	200 nM
	AGTGCTCACATGGCTGACTTTA	200 nM

Tabela 3.12: Parametry reakcji qRT-PCR.

Etap reakcji	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wyrównanie temperatury	50°C	2 min	1
Wstępna denaturacja	94°C	5 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
Przyłączanie starterów	60°C	30 s	
Elongacja	72°C	30 s	
	4°C	∞	

3.2.7 Profilowanie ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA

Profilowanie ekspresji genów wykonano na próbkach całkowitego RNA wyizolowanego z HIP samców zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.2.6.1. W tym przypadku stężenie, jakość i integralność otrzymanego RNA oceniono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem aparatu Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA), a do dalszej analizy wykorzystano wyłącznie próbki spełniające kryteria wartości współczynnika RIN (ang. *RNA integrity number*) większej niż 8,0. Wyselekcjonowane próbki RNA poddano reakcji PCR z odwrotną transkrypcją zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.2.6.2. Hybrydyzację otrzymanego cDNA do mikromacierzy GeneChip Mouse Genome 430A 2.0 (Affymetrix, USA) wykonano w Molecular Resource Center (University of Tennessee Health Science Center, USA). Analizę otrzymanych danych macierzowych przeprowadzono jak w Kreiner et al, 2013 [Kreiner et al., 2013]. W skrócie, surowe dane poddano normalizacji i przeliczono przy użyciu pakietów affy i gcrma z R/Bioconductor [Gentleman et al., 2004]. Analizę ontologiczną przeprowadzono przy użyciu metody Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) [Subramanian et al., 2005] i systemu klasyfikacji Panther [Mi et al., 2012]. Do identyfikacji wzorców ekspresji genów i wizualizacji danych wykorzystano oprogramowanie MeV MultiExperiment Viewer ver. 4.81. Surowe dane macierzowe zdeponowano w bazie danych Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

3.2.8 Oznaczenie ekspresji białek metodą Western Blot

3.2.8.1 Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Ekspresję wybranych białek zaangażowanych w procesy wewnątrzkomórkowego przekazu sygnału oznaczono w PFC i HIP samców i samic. Izolację i oznaczenie stężenia białka wykonano zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.2.4.1. Elektroforetyczny rozdział białek prowadzono w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) z wykorzystaniem żeli poliakrylamidowych 4-15% CriterionTM TGXTM Precast Gels (Bio-Rad, USA). Próbkę przygotowano przez zmieszanie

objętości odpowiadającej 15 μ g całkowitego białka z buforem obciążającym Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, USA) i 2-merkaptoetanołem (Sigma-Aldrich, USA), a następnie poddano je denaturacji w 95°C przez 5 min w termocyklerze T100 (Bio-Rad, USA) i schłodzono na lodzie. Jako drabinę białkową zastosowano Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards (Bio-Rad, USA). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze do elektroforezy (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3) przy napięciu 90V przez 30 min, a następnie przy napięciu 120V przez 90 min. Po tym czasie żele równoważono w buforze do transferu (48mM Tris, 39 mM glicyna, 20% metanol, 1,3 mM SDS, pH 9,2) w 4°C przez 20 min.

3.2.8.2 Elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową

Półsuchy elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego na 0,2 μ m membranę nitrocelulozową (Bio-Rad, USA) przeprowadzono przy użyciu aparatu ENDUROTM Semi-Dry Laboratory Blotter (Labnet International, USA) przy napięciu 20V przez 35 min. By ocenić wydajność transferu membrany wybarwiono odczynnikiem 1% Ponceau S (Bio-Rad, USA), a następnie przecięto poziomo w taki sposób by móc równolegle oznaczać białka o różnej masie cząsteczkowej i uniknąć stripowania membrany (procedury usuwania przeciwciał z membrany w celu immunodetekcji innych białek).

3.2.8.3 Immunodetekcja wybranych białek

Fragmenty membran wypłukano w buforze TBS-T (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4) do momentu odbarwienia odczynnika Ponceau S, a następnie poddano blokowaniu w 5% mleku odtłuszczonym (S.M. Gostyń, Polska) rozpuszczonym w buforze TBS-T, na wytrząsarce laboratoryjnej przez 1 h w temperaturze pokojowej. Inkubację z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi (Tabela 3.13) prowadzono przez noc na wytrząsarce laboratoryjnej w 4°C. Po tym czasie fragmenty membran płukano 3-krotnie przez 5-10 min w buforze TBS-T, a następnie inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi (Vector Laboratories, USA) przez 1 h w temperaturze pokojowej. Fragmenty membran ponownie płukano 3-krotnie przez 5-10 min w buforze TBS-T, a następnie

inkubowano przez 5 min z odczynnikiem Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA). Detekcję sygnału mierzono z wykorzystaniem systemu obrazowania PXi4 i oprogramowania GeneSys (Syngene, UK). Poziom sygnału oceniano za pomocą analizy gęstości optycznej otrzymanych punktów z wykorzystaniem programu Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Japonia).

Tabela 3.13: Przeciwciała pierwszorzędowe wykorzystane do immunodetekcji białek.

Antygen	Pochodzenie, klonalność	Zastosowane rozcieńczenie	Źródło (nr katalogowy)
p(Ser473)Akt	rabbit mAb	1:2500	Cell Signaling Technology, USA (4060)
Akt	rabbit pAb	1:3000	Cell Signaling Technology, USA (9272)
p(Tyr204)ERK1/2	mouse mAb	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, USA (sc-7383)
ERK1/2	rabbit pAb	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, USA (sc-93)
p(Ser21/9)GSK-3 α/β	rabbit pAb	1:1000	Cell Signaling Technology, USA (9331)
GSK-3 α/β	rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, USA (5676)
calnexin	rabbit pAb	1:1000	Enzo Life Sciences, USA (ADI-SPA-860)

3.2.9 Oznaczenie poziomu pierwiastków metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej

Poziom wapnia, magnezu, miedzi i cynku oznaczono w TH samców i samic za pomocą metody płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS, ang. *flame atomic absorption spectroscopy*). Oznaczenia te wykonano w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Tkanki zważono i poddano demineralizacji w 500 μ l kwasu azotowego Suprapur 65% nitric acid solution (Sigma-Aldrich, USA) w łaźni wodnej w 80°C przez 3 dni, a następnie rozcieńczono wodą demineralizowaną do końcowej objętości 3 ml. Tkankową zawartość pierwiastków zmierzono z wykorzystaniem spektrometru absorpcji atomowej M5100 ZL (PerkinElmer, USA). Przy wykonywaniu pomiarów zastosowano następujące roztwory standardów: Certipur Calcium standard solution (Sigma-Aldrich, USA), Certipur Magnesium standard solution (Sigma-Aldrich, USA), Certipur Copper standard solution (Sigma-Aldrich, USA) i Certipur Zinc standard solution (Sigma-Aldrich, USA). Do kalibracji wykorzystano standardową metodę dodatku wzorca. Próbkę wzorcową przygotowano z TH myszy, które nie otrzymywały iniekcji leków. Wyniki przedstawiono w przeliczeniu na masę mokrej tkanki mózgowej.

3.2.10 Analiza danych

Do obliczeń i wizualizacji danych, jeśli nie napisano inaczej, wykorzystano programy Microsoft Excel 2016 i 2019 (Microsoft, USA) oraz Prism 5.0 i 9.0 (GraphPad, USA). Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono stosując narzędzia programu Statistica 10 (StatSoft, USA). Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanych metod statystycznych zamieszczono pod rycinami i tabelami.

Rozdział 4

Wyniki

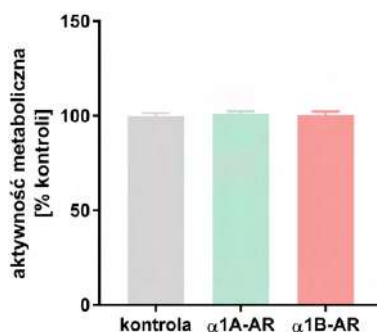
4.1 Modele *in vitro* - weryfikacja i charakterystyka

Do badań *in vitro* zaprojektowano i stworzono linie komórkowe ze stabilną ekspresją pojedynczego podtypu receptora adrenergicznego - α_{1A} (linia α_{1A} -AR) i α_{1B} (linia α_{1B} -AR), jak opisano w Rozdziale 3.1.1. W tym celu komórki PC12 transfekowano plazmidem pcDNA3.1(+) zawierającym gen kodujący jeden z podtypów α_1 -AR i wyselekcjonowano na podstawie wzrostu w obecności odpowiedniego antybiotyku. Wykazano, że stabilna ekspresja α_{1A} -AR lub α_{1B} -AR nie wpływa na aktywność metaboliczną komórek w teście redukcji resazury, w porównaniu do komórek PC12 niepoddanych transfekcji (Rycina 4.1). Stworzone linie komórkowe sprawdzono pod kątem funkcjonalności w oparciu o pomiar akumulacji wtórnego przekaźnika, fosforanu inozytolu (IP), w odpowiedzi na obecność związków o działaniu agonistycznym i antagonistycznym względem α_1 -AR (Rozdział 4.1.1).

Podjęto również próby stworzenia linii komórkowej ze stabilną ekspresją α_{1D} -AR, jednak ze względu na niepowodzenia, do dalszych badań zdecydowano się wykorzystać komercyjnie dostępną linię komórkową ChemiSCREENTM Ready-to-AssayTM α_{1D} Adrenergic Family Receptor Frozen Cells, która charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji ludzkiego α_{1D} -AR na powierzchni komórek (linia α_{1D} -AR).

W celu przeprowadzenia charakterystyki genetycznych modeli *in vitro* we wszystkich trzech liniach wykonano analizę saturacyjną wiązania radioliganda,

[^3H]-prazosyny. Na tej podstawie wyznaczono parametry wiązania dla poszczególnych podtypów α_1 -AR oraz zbadano ich gęstość na powierzchni komórek (Rozdział 4.1.2).



Rycina 4.1: Aktywność metaboliczna komórek ze stabilną ekspresją α_{1A} (α_{1A} -AR) i α_{1B} (α_{1B} -AR) w porównaniu do komórek niepoddanych transfekcji (kontrola). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 2-4$ studzienek.

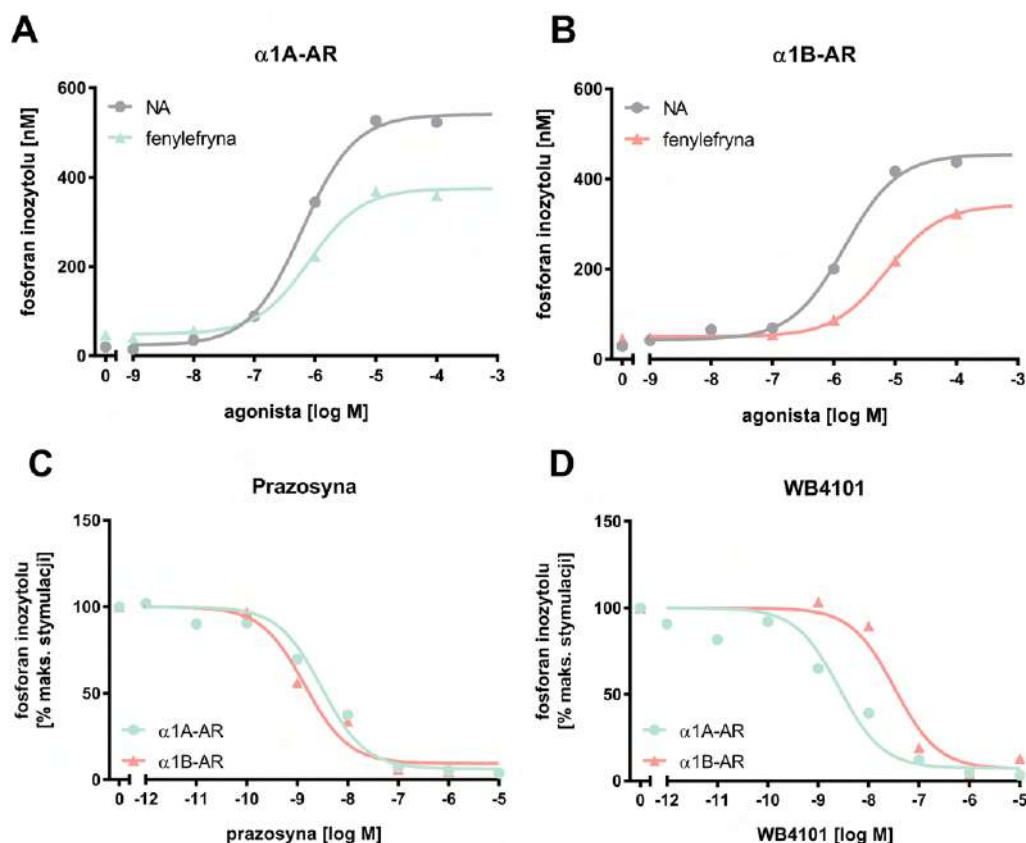
4.1.1 Ocena funkcjonalności linii komórkowych ze stabilną ekspresją α_{1A} -AR i α_{1B} -AR

Utworzone linie komórkowe α_{1A} -AR i α_{1B} -AR poddano weryfikacji pod względem funkcjonalności wklonowanych receptorów. W tym celu wykonano pomiar akumulacji IP w odpowiedzi na stymulację α_1 -AR wywołaną działaniem agonistów - noradrenaliny (NA) i fenylefryny (Rycina 4.2 A, B). Wyznaczone na podstawie tych pomiarów wartości EC_{50} wskazują na porównywalny poziom aktywacji obu podtypów α_1 -AR w wyniku działania NA i fenylefryny (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Odpowiedź komórek na stymulację α_1 -AR wywołaną działaniem agonistów.

Linia komórkowa	Noradrenalina EC_{50} [log M]	Fenylefryna EC_{50} [log M]
α_{1A} -AR	-6,2	-6,1
α_{1B} -AR	-5,8	-5,1

Wartości EC_{50} wyznaczono z krzywych zależności stężeń IP od stężeń agonisty za pomocą metody regresji nieliniowej.



Rycina 4.2: Akumulacja fosforanu inozytolu przez komórki ze stabilną ekspresją α_{1A} -AR i α_{1B} -AR w odpowiedzi na obecność związków o działaniu agonistycznym - noradrenalinę (NA) i fenylefrynę (A, B), oraz hamowanie akumulacji fosforanu inozytolu w odpowiedzi na działanie noradrenaliny (zaznaczone jako 100%) w sytuacji obecności związków o działaniu antagonistycznym - prazosyny i WB4101 (C, D).

Wykonano także pomiar akumulacji IP w odpowiedzi na stymulację α_1 -AR wywołaną działaniem NA (w stężeniu równym wartości EC_{90}) po wcześniejszej ekspozycji na działanie antagonistów - prazosyny i WB4101 (Rycina 4.2 C, D). Wyznaczone na podstawie tych pomiarów wartości IC_{50} wskazują na porównywalny poziom inhibicji α_{1A} w wyniku działania obu antagonistów oraz silniejszą inhibicję podtypu α_{1B} w wyniku działania prazosyny niż WB4101 (Tabela 4.2).

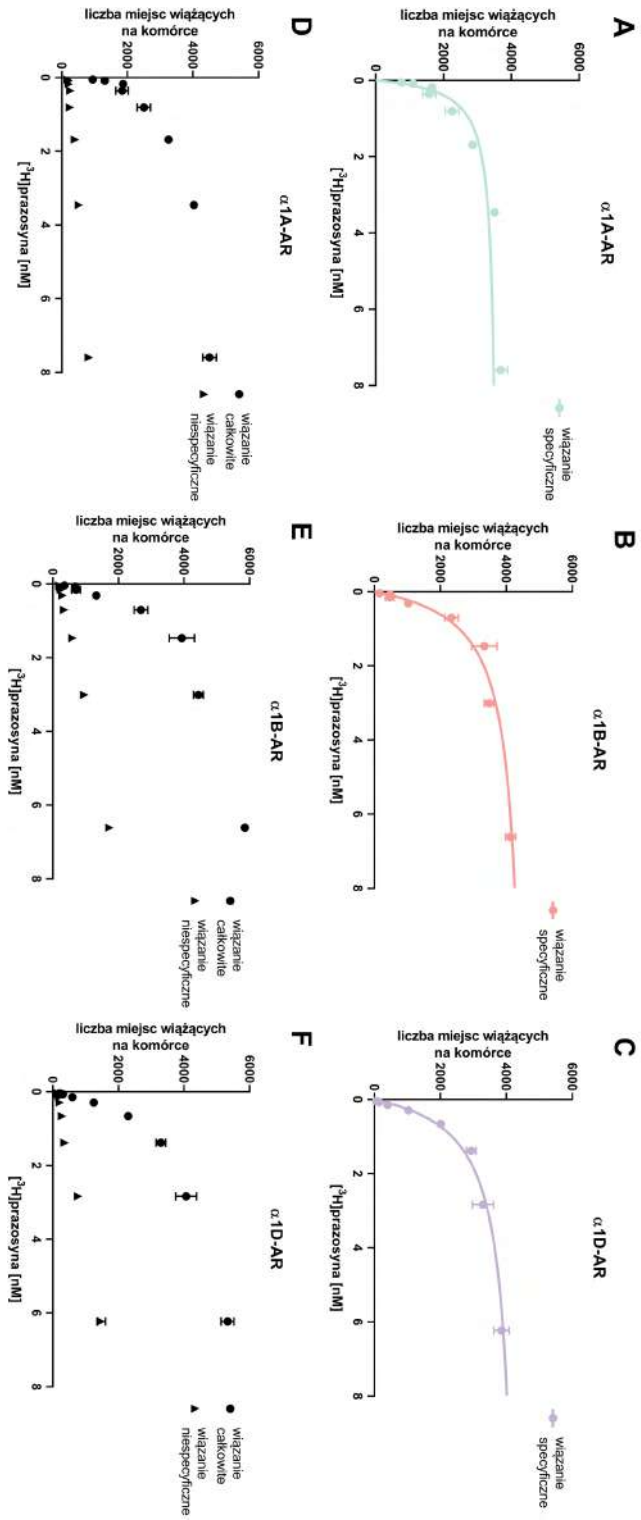
Tabela 4.2: Odpowiedź komórek na stymulację α_1 -AR poprzedzoną działaniem antagonistów.

Linia komórkowa	Prazosyna IC_{50} [log M]	WB4101 IC_{50} [log M]
α_1A -AR	-8,5	-8,6
α_1B -AR	-8,8	-7,5

Wartości IC_{50} wyznaczono z krzywych zależności stężeń IP od stężeń agonisty za pomocą metody regresji nieliniowej.

4.1.2 Badanie gęstości podtypów α_1 -AR na powierzchni komórek

Na liniach komórkowych α_1A -AR, α_1B -AR i α_1D -AR przeprowadzono analizę saturacyjną wiązania [3H]-prazosyny (tzw. radioligand binding assay). Oznaczenie to wykonano z zastosowaniem różnych stężeń radioliganda (wiązaną całkowitą) oraz z zastosowaniem różnych stężeń radioliganda przy stałym stężeniu nieznakowanego liganda wysycającego miejsca niespecyficznego łączenia się radioliganda do receptora (wiązaną niespecyficzną) (Rycina 4.3 D, E, F). Wiązanie specyficzne wyznaczono przez odjęcie sygnału niespecyficznego od całkowitego w przeliczeniu na 1 mg białka (Rycina 4.3 A, B, C). Wyznaczona na jego podstawie maksymalna liczba miejsc wiążących na powierzchni komórek (B_{max}) jest zbliżona dla wszystkich trzech linii komórkowych, a wartości stałych dysocjacji (K_d) wskazują na wysokie powinowactwo wiązania [3H]-prazosyny (Tabela 4.3).



Rycina 4.3: Krzywe saturacyjne wiązania [³H]-prazosyna dla komórek α1A-AR (A, D), α1B-AR (B, E) i α1D-AR (C, F). Dane odpowiadają wartościom średnich ± SEM z 4 eksperymentów przeprowadzonych w tetraplikatach.

Tabela 4.3: Parametry wiązania [^3H]prazosyny dla komórek $\alpha 1\text{A-AR}$, $\alpha 1\text{B-AR}$ i $\alpha 1\text{D-AR}$.

Linia komórkowa	K_d [nM]	B_{max}
$\alpha 1\text{A-AR}$	$0,32 \pm 0,08$	3622 ± 247
$\alpha 1\text{B-AR}$	$0,83 \pm 0,16$	4694 ± 294
$\alpha 1\text{D-AR}$	$0,90 \pm 0,14$	4470 ± 240

Wartości stałej dysocjacji (K_d) i maksymalnej liczby miejsc wiążących (B_{max}) wyznaczono z krzywych saturacyjnych wiązania [^3H]-prazosyny. Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z 4 eksperymentów przeprowadzonych w tetraplikatach.

4.2 Modele *in vitro* - efekty leków przeciwdepresyjnych

W celu określenia efektów leków przeciwdepresyjnych (LPD) na poszczególne podtypy $\alpha_1\text{-AR}$, zbadano odpowiedź komórek z linii $\alpha 1\text{A-AR}$, $\alpha 1\text{B-AR}$ i $\alpha 1\text{D-AR}$ na stymulację wywołaną działaniem NA i ekspozycją na działanie LPD z różnych grup (Rozdział 4.2.1). Jak wcześniej, odpowiedź komórek oceniano w oparciu o pomiar akumulacji wtórnych przekazników - IP w przypadku komórek $\alpha 1\text{A-AR}$ i $\alpha 1\text{B-AR}$ lub jonów wapnia (Ca^{2+}) w przypadku komórek $\alpha 1\text{D-AR}$. Wybór ten był podyktowany faktem, że linia ChemiSCREENTM Ready-to-AssayTM α_{1D} Adrenergic Family Receptor Frozen Cells została stworzona ze szczególnym przeznaczeniem do oznaczeń Ca^{2+} .

Jako że w wyniku wielokrotnych podań LPD może dochodzić do zmian wrażliwości receptorów, zbadano również odpowiedź komórek z linii $\alpha 1\text{A-AR}$, $\alpha 1\text{B-AR}$ i $\alpha 1\text{D-AR}$ na stymulację wywołaną działaniem NA po wcześniejszej ekspozycji przez 24 h lub 120 h na działanie LPD z różnych grup (Rozdział 4.2.2).

4.2.1 Ocena wpływu leków przeciwdepresyjnych na aktywację podtypów $\alpha_1\text{-AR}$

Wpływ LPD na aktywację podtypów $\alpha_1\text{-AR}$ oceniono na podstawie pomiaru akumulacji wtórnych przekazników w odpowiedzi na stymulację komórek z li-

nii $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR wywołaną działaniem NA (w stężeniu równym wartości EC_{90}) i ekspozycją przez 10 min na działanie LPD (w zakresie różnych stężeń) (Rycina 4.4). Zastosowano LPD z następujących grup:

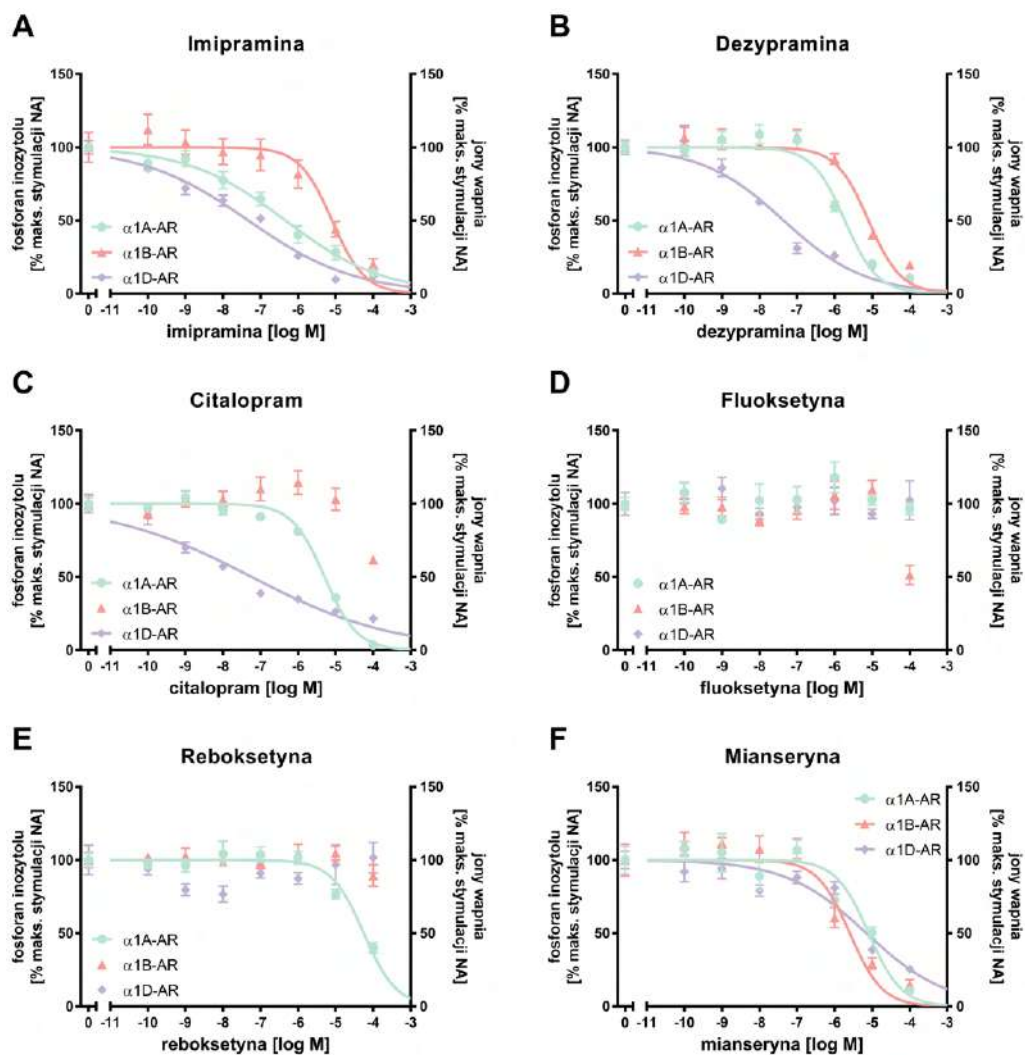
- TLPD - imipramina (IMI), dezipramina (DMI),
- SSRIs - citalopram (CIT), fluoksetyna (FLU),
- NRIs - reboksetyna (REB),
- TeCAs - mianseryna (MIA).

Uzyskane wyniki wskazują na zmniejszenie wrażliwości wszystkich podtypów $\alpha 1$ -AR na stymulację wywołaną działaniem NA i inkubacją z IMI (Rycina 4.4 A), DMI (Rycina 4.4 B) lub MIA (Rycina 4.4 F). Przy czym dopasowane krzywe inhibicji i wyznaczone na ich podstawie wartości IC_{50} świadczą o różnym nasileniu tego efektu w zależności od linii komórkowej, szczególnie w przypadku IMI i DMI (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Odpowiedź komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR na stymulację wywołaną działaniem noradrenaliny i ekspozycją na działanie LPD z różnych grup.

LPD	$\alpha 1A$ -AR IC_{50} [log M]	$\alpha 1B$ -AR IC_{50} [log M]	$\alpha 1D$ -AR IC_{50} [log M]
IMI	$-6,33 \pm 0,14$	$-5,09 \pm 0,13$	$-7,32 \pm 0,09$
DMI	$-5,73 \pm 0,08$	$-5,10 \pm 0,06$	$-7,35 \pm 0,13$
CIT	$-5,29 \pm 0,04$	> -4	$-7,23 \pm 0,13$
FLU	—	> -4	—
REB	$-4,25 \pm 0,09$	—	—
MIA	$-5,09 \pm 0,12$	$-5,59 \pm 0,11$	$-5,15 \pm 0,15$

Wartości IC_{50} wyznaczono z krzywych zależności stężeń wtórnych przekazników od stężeń LPD za pomocą metody regresji nieliniowej. Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z co najmniej 3 eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. IMI - imipramina, DMI - dezipramina, CIT - citalopram, FLU - fluoksetyna, REB - reboksetyna, MIA - mianseryna.



Rycina 4.4: Akumulacja wtórnych przekazników przez komórki $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR w odpowiedzi na stymulację wywołaną działaniem noradrenaliny i ekspozycją na działanie LPD z różnych grup - imipraminy (A), dezypraminy (B), citalopramu (C), fluoksetyny (D), reboksetyny (E) lub mianseryny (F). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z co najmniej 3 eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach.

Wyraźnie większe zróżnicowanie w zależności od podtypu α_1 -AR odnotowano w wyniku działania REB, która zmniejszyła poziom aktywacji wyłącznie podtypu α_{1A} (Rycina 4.4 E), oraz w wyniku działania CIT, który zmniejszył poziom aktywacji podtypów α_{1A} i α_{1D} , a na podtyp α_{1B} zadziałał hamująco wyłącznie w najwyższym badanym stężeniu (Rycina 4.4 C).

Ponadto zaobserwowano, że w zakresie badanych stężeń FLU nie wykazała wpływu na odpowiedź komórek α_{1A} -AR, α_{1B} -AR i α_{1D} -AR na stymulację wywołaną działaniem NA (Rycina 4.4 D).

W oparciu o wartości IC_{50} wyznaczone z krzywych zależności stężeń wtórnych przekazników od stężeń LPD dla poszczególnych linii komórkowych (Tabela 4.4), uporządkowano hamujący wpływ badanych LPD na poziom aktywacji podtypów α_1 -AR w zależności od jego nasilenia (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Kolejność LPD w zależności od nasilenia ich hamującego wpływu na poziom aktywacji poszczególnych podtypów α_1 -AR w odpowiedzi na stymulację wywołaną działaniem noradrenaliny.

Linia komórkowa	Kolejność LPD
α_{1A} -AR	IMI <*** DMI <*** CIT <*** MIA <*** REB
α_{1B} -AR	MIA <*** IMI = DMI
α_{1D} -AR	IMI = DMI <*** CIT <*** MIA

LPD uporządkowano w oparciu o wartości IC_{50} wyznaczone z krzywych zależności stężeń wtórnych przekazników od stężeń LPD dla linii komórkowych α_{1A} -AR, α_{1B} -AR i α_{1D} -AR. Dane analizowano metodą wielokrotnych porównań w oparciu o statystykę t z korektą Sidaka. *** $p < 0.0001$. IMI - imipramina, DMI - dezipramina, CIT - citalopram, REB - reboksetyna, MIA - mianseryna.

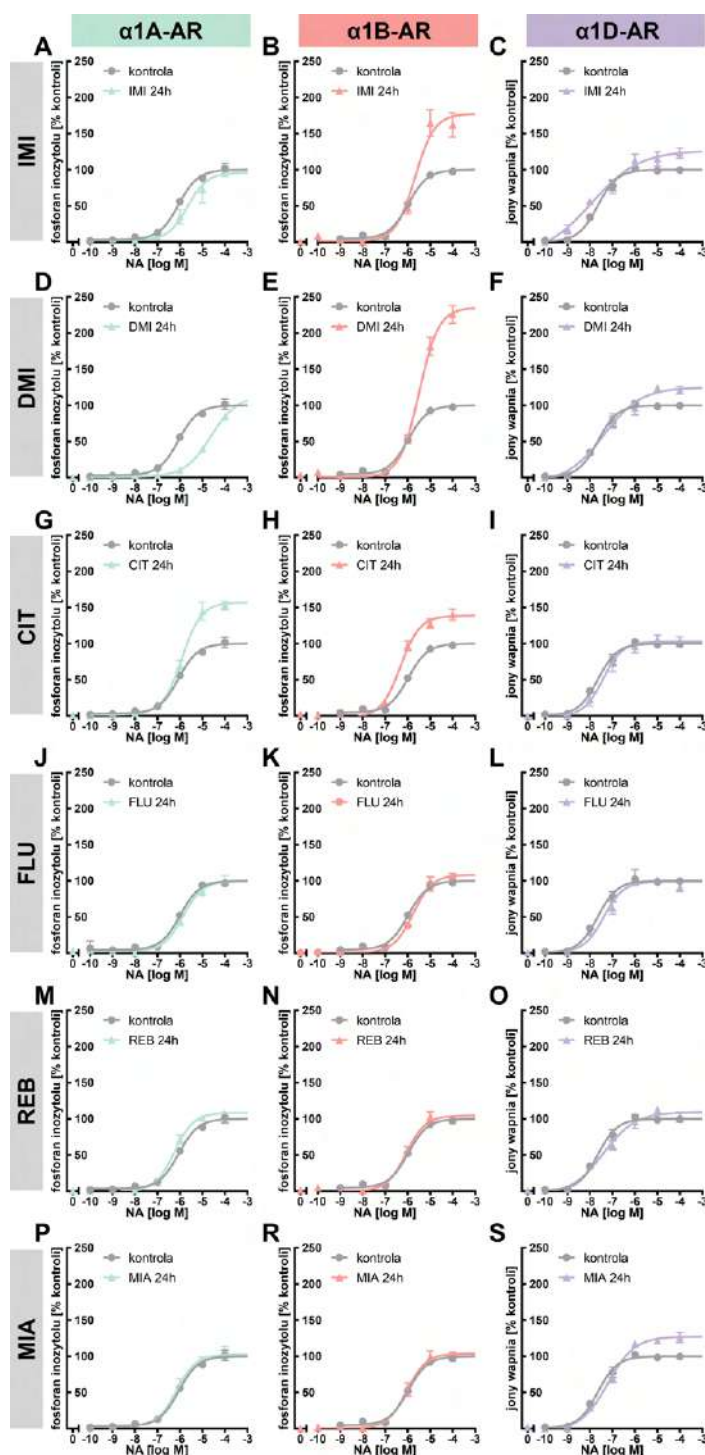
Wykazano, że ekspozycja komórek α_{1A} -AR, α_{1B} -AR i α_{1D} -AR przez 30 min na działanie badanych LPD nie wpłynęła na ich aktywność metaboliczną w teście redukcji resazury, w porównaniu do komórek niepoddanych działaniu LPD (Rycina 4.7 A).

4.2.2 Ocena wpływu 24 h i 120 h inkubacji z lekami przeciwdespresyjnymi na aktywację podtypów α_1 -AR

W celu określenia efektów przedłużonej ekspozycji na działanie LPD na aktywację podtypów α_1 -AR, oznaczono poziom akumulacji wtórnych przekazników w odpowiedzi na stymulację komórek z linii α_1A -AR, α_1B -AR i α_1D -AR wywołaną działaniem NA (w zakresie różnych stężeń) po wcześniejszej ekspozycji przez 24 h (Rycina 4.5) lub 120 h (Rycina 4.6) na działanie LPD (w stałym stężeniu). Zastosowano taki sam panel LPD jak w Rozdziale 4.2.1. Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono, że:

- ekspozycja przez 24 h na działanie **IMI** doprowadziła do zwiększenia maksymalnej odpowiedzi na stymulację wywołaną działaniem NA wyłącznie w przypadku komórek α_1B -AR, a ekspozycja przez 120 h dodatkowo zwiększyła maksymalną odpowiedź komórek α_1D -AR i obniżyła wartości EC_{50} obu tych receptorów,
- ekspozycja przez 24 h na działanie **DMI** doprowadziła do obniżenia wartości EC_{50} zarówno podtypu α_{1A} jak i α_{1B} oraz zwiększenia maksymalnej odpowiedzi komórek α_1B -AR, natomiast ekspozycja przez 120 h obniżyła wartość EC_{50} wyłącznie podtypu α_{1B} i zwiększyła maksymalną odpowiedź komórek α_1B -AR i α_1D -AR,
- ekspozycja przez 24 h na działanie **CIT** doprowadziła do zwiększenia maksymalnej odpowiedzi komórek α_1A -AR i α_1B -AR, a efekt ten nie uległ zmianie przy ekspozycji przez 120 h,
- ekspozycja przez 24 h na działanie **MIA** nie wpłynęła na wartości EC_{50} i maksymalnej odpowiedzi badanych receptorów, natomiast ekspozycja przez 120 h obniżyła wartość EC_{50} podtypu α_{1D} i zwiększyła maksymalną odpowiedź komórek α_1B -AR i α_1D -AR,
- ekspozycja przez 24 h i 120 h na działanie **FLU** lub **REB** nie wpłynęła na wartości EC_{50} i maksymalnej odpowiedzi badanych receptorów.

4.2. MODELE *IN VITRO* - EFEKTY LEKÓW PRZECIWDEPRESYJNYCH



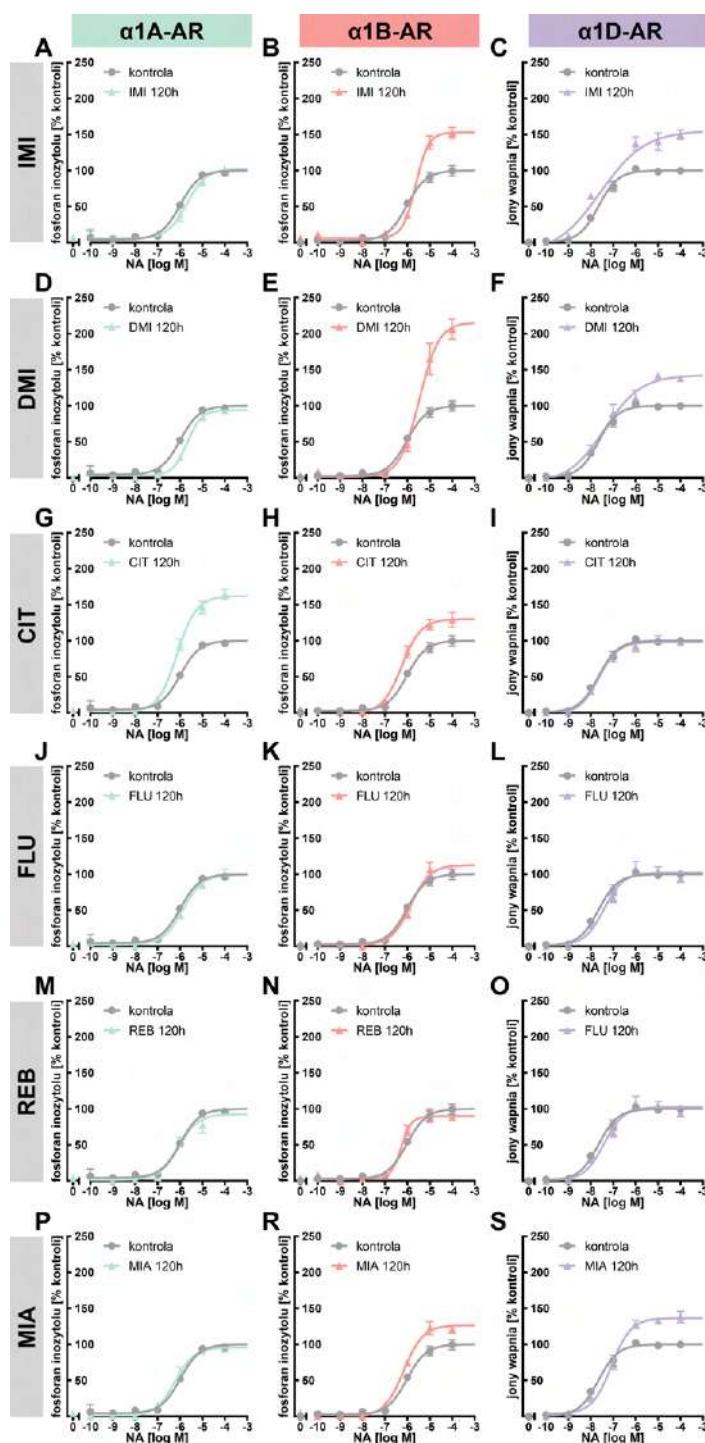
Rycina 4.5: Akumulacja wtórnych przekazników przez komórki $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR w odpowiedzi na stymulację wywołaną działaniem noradrenaliny po wcześniejszej ekspozycji przez 24 h na działanie LPD z różnych grup - imipraminy (A, B, C), dezipraminy (D, E, F), citalopramu (G, H, I), fluoksetyny (J, K, L), reboksetyny (M, N, O) lub mianseryny (P, R, S). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z co najmniej 4 eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach.

Tabela 4.6: Odpowiedź komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR na stymulację wywołaną działaniem noradrenaliny po wcześniejszej ekspozycji przez 24 h na działanie LPD z różnych grup.

24 h	$\alpha 1A$ -AR		$\alpha 1B$ -AR		$\alpha 1D$ -AR	
	EC ₅₀ [log M]	MAX	EC ₅₀ [log M]	MAX	EC ₅₀ [log M]	MAX
kontrola	-6,1 ± 0,1	100 ± 3	-6,0 ± 0,1	100 ± 2	-7,7 ± 0,1	100 ± 2
IMI	-5,7 ± 0,2	96 ± 8	-5,7 ± 0,1	177 ± 11 ***	-7,9 ± 0,4	127 ± 9
DMI	-4,6 ± 0,2 ***	113 ± 12	-5,5 ± 0,1 **	235 ± 8 ***	-7,4 ± 0,2	125 ± 7
CIT	-5,9 ± 0,1	157 ± 5 ***	-6,3 ± 0,1	139 ± 4 *** ###	-7,4 ± 0,1	103 ± 4
FLU	-5,9 ± 0,2	93 ± 6	-5,8 ± 0,1	108 ± 5	-7,4 ± 0,1	99 ± 4
REB	-6,2 ± 0,1	108 ± 3	-6,1 ± 0,1	105 ± 4	-7,4 ± 0,2	109 ± 5
MIA	-6,1 ± 0,1	103 ± 4	-6,0 ± 0,1	104 ± 4	-7,2 ± 0,1	127 ± 4

Komórki kontrolne inkubowano z PBS. Wartości EC₅₀ i maksymalnej odpowiedzi (MAX) wyznaczono z krzywych zależności stężeń wtórnych przekąźników od stężeń LPD za pomocą metody regresji nieliniowej. Dane odpowiadają wartościom średnich ± SEM z co najmniej 4 eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach, analizowanych metodą dwuczynnikowej analizy wariancji (two-way ANOVA) i testem post hoc wielokrotnych porównań Holma-Sidak. ** p < 0.01 vs. kontrola, *** p < 0.001 vs. kontrola, ### p < 0.001 vs. $\alpha 1A$ -AR CIT. IMI - imipramina, DMI - dezipramina, CIT - citalopram, FLU - fluoksetyna, REB - reboksetyna, MIA - mianseryna.

4.2. MODELE *IN VITRO* - EFEKTY LEKÓW PRZECIWDEPRESYJNYCH



Rycina 4.6: Akumulacja wtórnych przekźników przez komórki $\alpha1A$ -AR, $\alpha1B$ -AR i $\alpha1D$ -AR w odpowiedzi na stymulację wywołaną działaniem noradrenaliny po wcześniejszej ekspozycji przez 120 h na działanie LPD z różnych grup - imipraminy (A, B, C), dezipraminy (D, E, F), citalopramu (G, H, I), fluoksetyny (J, K, L), reboksetyny (M, N, O) lub mianseryny (P, R, S). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z co najmniej 4 eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach.

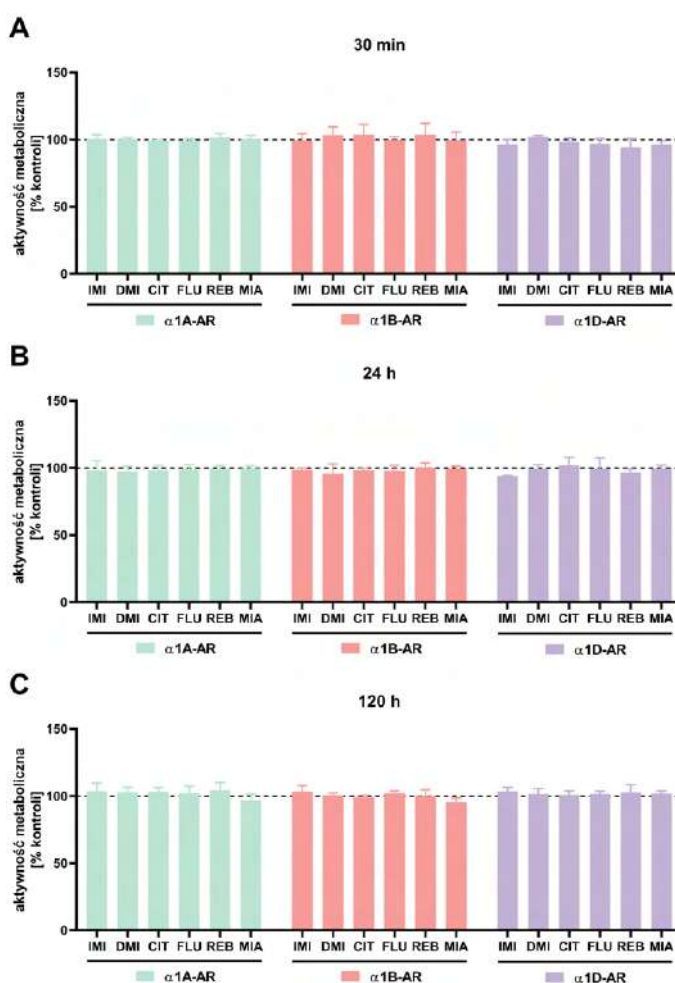
Tabela 4.7: Odpowiedź komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR na stymulację wywołaną działaniem noradrenaliny po wcześniejszej ekspozycji przez 120 h na działanie LPD z różnych grup.

120 h	$\alpha 1A$ -AR		$\alpha 1B$ -AR		$\alpha 1D$ -AR	
	EC ₅₀ [log M]	MAX	EC ₅₀ [log M]	MAX	EC ₅₀ [log M]	MAX
kontrola	-6,1 ± 0,1	100 ± 3	-6,0 ± 0,1	100 ± 4	-7,7 ± 0,1	100 ± 2
IMI	-5,7 ± 0,1	103 ± 5	-5,6 ± 0,1 **	153 ± 6 ***	-7,2 ± 0,1 *	155 ± 10 ***
DMI	-5,7 ± 0,1	94 ± 3	-5,5 ± 0,1 ***	215 ± 12 ***	-7,4 ± 0,2	143 ± 7 ***
CIT	-6,1 ± 0,1	162 ± 5 ***	-6,3 ± 0,1	130 ± 5 *** ###	-7,7 ± 0,1	98 ± 2
FLU	-5,9 ± 0,1	99 ± 4	-5,9 ± 0,1	113 ± 5	-7,4 ± 0,1	102 ± 3
REB	-6,3 ± 0,1	93 ± 5	-6,3 ± 0,1	90 ± 4	-7,4 ± 0,1	104 ± 4
MIA	-6,2 ± 0,1	96 ± 3	-6,2 ± 0,1	127 ± 4 **	-7,1 ± 0,1 ***	137 ± 3 ***

Komórki kontrolne inkubowano z PBS. Wartości EC₅₀ i maksymalnej odpowiedzi (MAX) wyznaczono z krzywych zależności stężeń wtórnych prekażników od stężeń LPD za pomocą metody regresji nieliniowej. Dane odpowiadają wartościom średnich ± SEM z co najmniej 4 eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach, analizowanych metodą dwuczynnikowej analizy wariancji (two-way ANOVA) i testem post hoc wielokrotnych porównań Holma-Sidak. * p < 0.05 vs. kontrola, ** p < 0.01 vs. kontrola, *** p < 0.001 vs. kontrola, ### p < 0.001 vs. $\alpha 1A$ -AR CIT. IMI - imipramina, DMI - dezipramina, CIT - citalopram, FLU - fluoksetyna, REB - reboksetyna, MIA - mianseryna.

4.2. MODELE *IN VITRO* - EFEKTY LEKÓW PRZECIWDEPRESYJNYCH

Wykazano, że ekspozycja komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR przez 24 h lub 120 h na działanie badanych LPD nie wpłynęła na ich aktywność metaboliczną w teście redukcji resazuryny, w porównaniu do komórek niepoddanych działaniu LPD (Rycina 4.7 B, C).

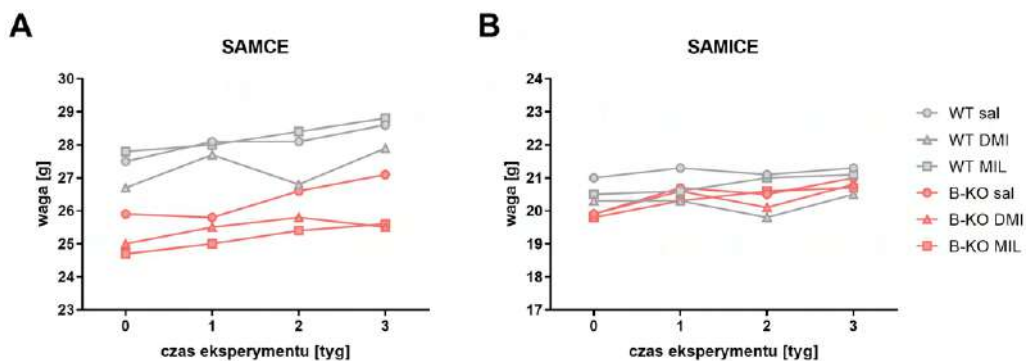


Rycina 4.7: Aktywność metaboliczna komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR po ekspozycji na działanie LPD przez 30 min (A), 24 h (B) lub 120 h (C), w porównaniu do komórek kontrolnych inkubowanych z PBS (linia przerywana). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SD z $n = 3-4$ eksperymentów. IMI - imipramina, DMI - dezipramina, CIT - citalopram, FLU - fluoksetyna, REB - reboksetyna, MIA - mianseryna.

4.3 Modele *in vivo* - weryfikacja i charakterystyka

Do badań *in vivo* sprowadzono zwierzęta z mysiej linii transgenicznej typu knockout, z unieczynnieniem wszystkich trzech podtypów α_1 -AR (ABD-KO). W celu weryfikacji mutacji i oceny jej wpływu na gęstość AR w mózgu przeprowadzono odpowiednie badania autoradiograficzne (Rozdział 4.3.1).

Z uwagi na obniżoną płodność charakterystyczną dla tej linii transgenicznej oraz trudności w utrzymaniu miotów wynikających z adaptacji zwierząt do nowego środowiska, z linii ABD-KO wyprowadzono trzy linie z selektywną mutacją jednego podtypu α_1 -AR. Zwierzęta z linii A-KO, B-KO i D-KO mnożyły się z efektywnością porównywalną do osobników typu dzikiego (WT), nie wykazywały widocznych oznak upośledzenia i przybierały na wadze proporcjonalnie do osobników WT (Rycina 4.8).



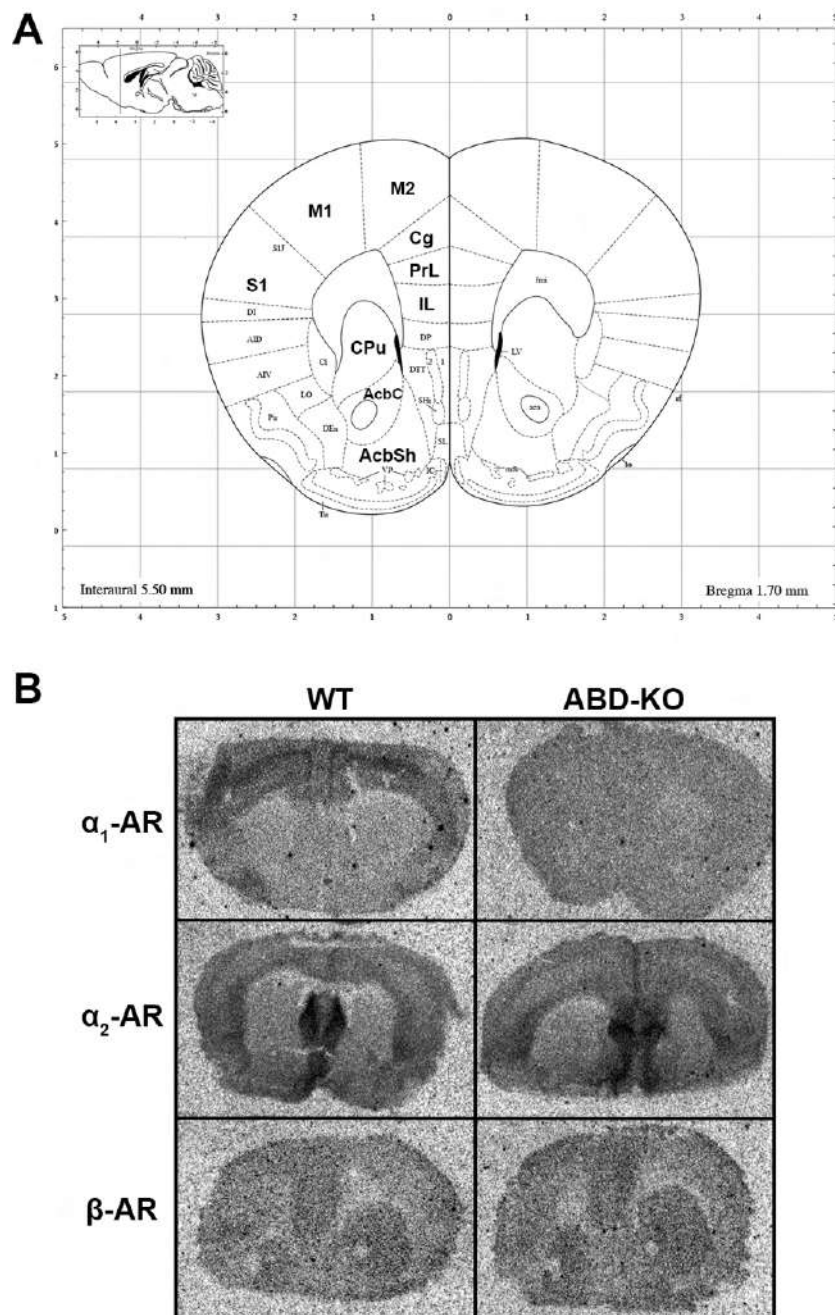
Rycina 4.8: Wagi samców (A) i samic (B) w czasie trwania eksperymentu, na przykładzie myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1B} (B-KO), którym podawano sól fizjologiczną (sal), dezipraminę (DMI) lub milnacipran (MIL). Dane odpowiadają wartościom średnich z $n = 7-8$ osobników.

W celu przeprowadzenia charakterystyki genetycznych modeli *in vivo* zbadano wpływ mutacji na poziom wybranych neuroprzekaźników i ich metabolitów w podwzgórz (HY) (Rozdział 4.3.2) oraz na ekspresję białek apoptotycznych w hipokampie (HIP) (Rozdział 4.3.3).

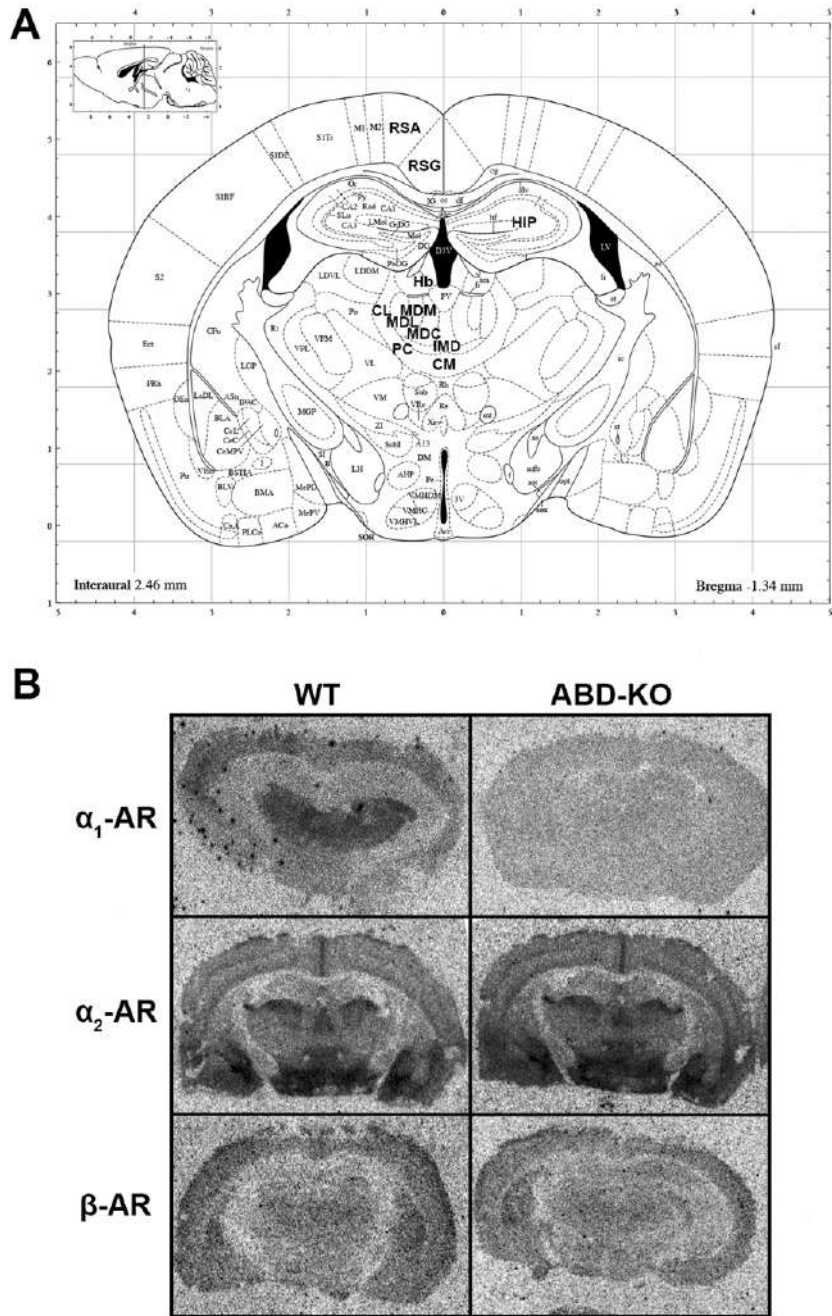
4.3.1 Ocena efektywności mutacji linii transgenicznej ABD-KO

Mysią linię transgeniczną ABD-KO zweryfikowano pod kątem efektywności mutacji na obecność α_1 -AR, którą oceniono na podstawie obecności miejsc wiążących [3 H]-prazosynę, oraz pod kątem wpływu mutacji na inne podklasy AR. W tym celu przeprowadzono badania autoradiograficzne na skrawkach mózgu samca ABD-KO i samca WT, w których oznaczono rozmieszczenie i gęstość receptorów α_1 -AR, α_2 -AR oraz β -AR. Do oznaczeń wybrano skrawki mózgowe odpowiadające przekrojom na poziomie +1,70 mm (Rycina 4.9) i -1,34 mm (Rycina 4.10) od punktu bregma, co było podyktowane dostępnymi w literaturze danymi na temat lokalizacji AR w mózgu, a w szczególności α_1 -AR, których wysoką ekspresję odnotowuje się w korze mózgowej, hipokampie i wzgórzu (Rozdział 1.1.4).

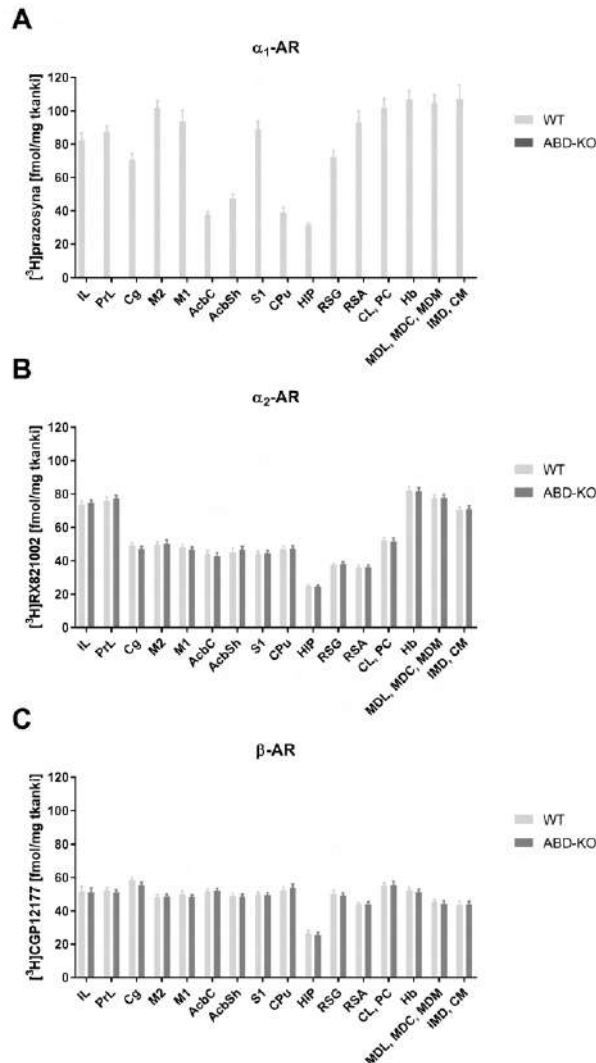
W przypadku oznaczeń gęstości α_1 -AR u myszy ABD-KO odnotowano sygnał pochodzący wyłącznie od niespecyficznego wiązania tła (Rycina 4.11 A). Brak sygnału specyficznego w analizowanych strukturach mózgowych wskazuje na brak lub śladową ilość miejsc wiążących [3 H]-prazosynę, co potwierdza efektywność mutacji polegającej na unieczynnieniu wszystkich trzech podtypów α_1 -AR. Ponadto, na podstawie oznaczeń gęstości α_2 -AR i β -AR wykazano brak wpływu mutacji na gęstość tych receptorów w badanych strukturach mózgowych (Rycina 4.11 B, C).



Rycina 4.9: (A) Schemat struktur mózgowych w przekroju czołowym mózgu myszy na poziomie +1,70 mm od punktu bregma (z Paxinos and Franklin, 2001). Rozwinięcie skrótów zamieszczono pod Ryciną 4.11. (B) Przykładowe obrazy autoradiograficzne wiązania radioliganda z receptorami adrenergicznymi α_1 (α_1 -AR), α_2 (α_2 -AR) i β (β -AR) w mózgu myszy typu dzikiego (WT, lewa kolumna) i myszy typu knockout z unieczynnieniem wszystkich trzech podtypów α_1 -AR (ABD-KO, prawa kolumna). Skrawki odpowiadają przekrojowi czołowemu na poziomie +1,70 mm od punktu bregma.



Rycina 4.10: (A) Schemat struktur mózgowych w przekroju czołowym mózgu myszy na poziomie -1,34 mm od punktu bregma (z Paxinos and Franklin, 2001). Rozwinięcie skrótów zamieszczono pod Ryciną 4.11. (B) Przykładowe obrazy autoradiograficzne wiązania radioliganda z receptorami adrenergicznymi α_1 (α_1 -AR), α_2 (α_2 -AR) i β (β -AR) w mózgu myszy typu dzikiego (WT, lewa kolumna) i myszy typu knockout z unieczynnieniem wszystkich trzech podtypów α_1 -AR (ABD-KO, prawa kolumna). Skrawki odpowiadają przekrojowi czołowemu na poziomie -1,34 mm od punktu bregma.

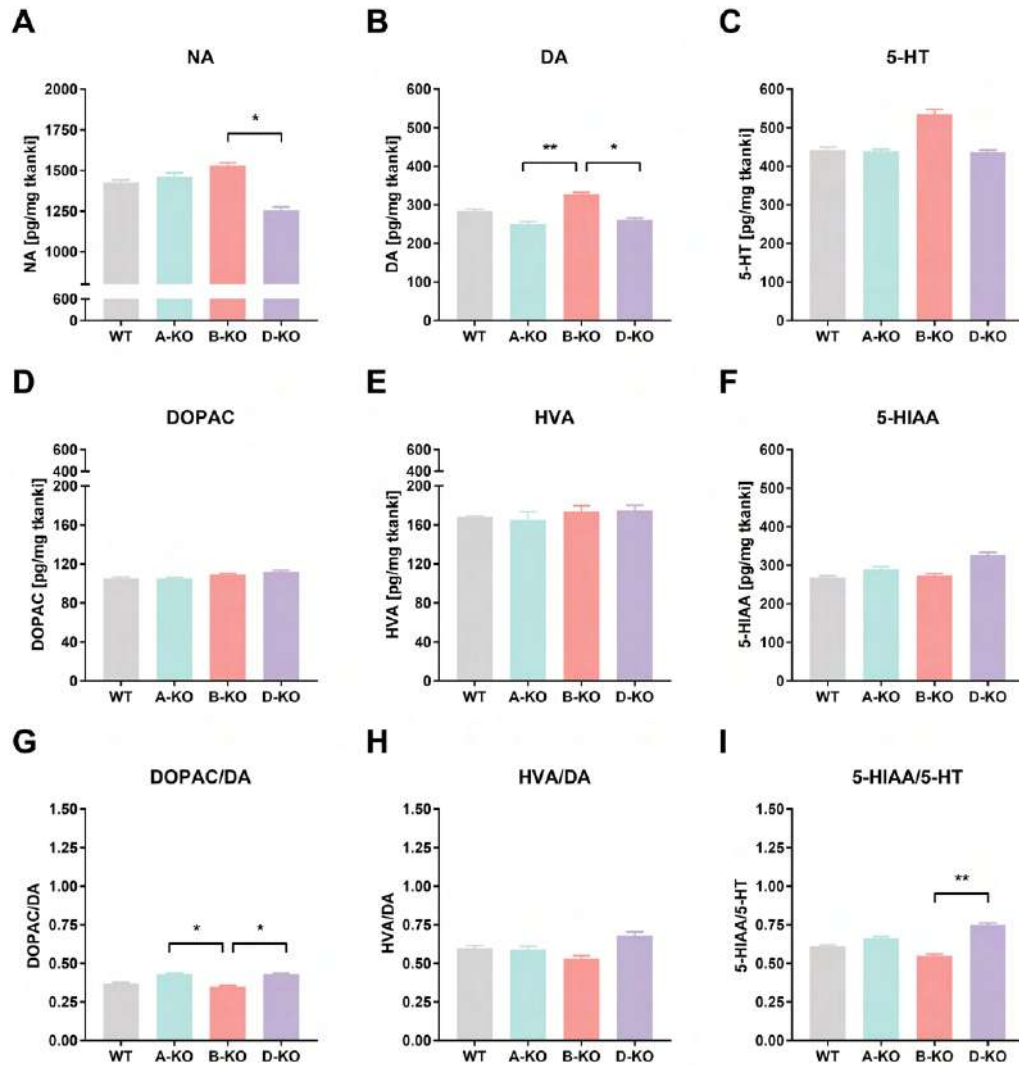


Rycina 4.11: Gęstość receptorów adrenergicznych α_1 (α_1 -AR) (A), α_2 (α_2 -AR) (B) i β (β -AR) (C) w wybranych strukturach mózgowych myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z unieczynnieniem wszystkich trzech podtypów α_1 -AR (ABD-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich sygnału specyficznego $\pm$ SEM z $n = 9$ skrawków, analizowanych metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testem post-hoc najmniejszych istotnych różnic (Fisher LSD). IL - kora infralimbiczna, PrL - kora prelimbiczna, Cg - kora zakrętu obręczy, M2 - drugorzędowa kora ruchowa, M1 - pierwszorzędowa kora ruchowa, AcbC - rdzeń jądra półleżącego, AcbSh - powłoka jądra półleżącego, S1 - pierwszorzędowa kora czuciowa, CPu - prążkowie, HIP - hipokamp, RSG - pole ziarniste kory retrosplenialnej, RSA - pole dysgranularne kory retrosplenialnej, CL - jądro środkowo-boczne wzgórza, PC - jądro tylnio-środkowe wzgórza, Hb - jądra uzdeczki, MDL - jądro przyśrodkowo-grzbietowo-boczne wzgórza, MDC - jądro przyśrodkowo-grzbietowo-środkowe wzgórza, MDM - jądro przyśrodkowo-grzbietowo-przyśrodkowe wzgórza, IMD - jądro pośrednio-przyśrodkowo-grzbietowe wzgórza, CM - jądro środkowo-przyśrodkowe wzgórza.

4.3.2 Wpływ delecji podtypów α_1 -AR na poziomy wybranych neuroprzekaźników i ich metabolitów

Charakterystykę mysich linii transgeniczných A-KO, B-KO i D-KO rozpoczęto od zbadania wpływu mutacji na poziom noradrenaliny (NA), dopaminy (DA), jej metabolitów kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC) i kwasu homowanilinowego (HVA) oraz serotoniny (5-HT) wraz z jej metabolitem kwasem 5-hydroksyindoloctowego (5-HIAA) w podwzgórzu (HY) samców. Do pomiaru stężeń tych neuroprzekaźników wykorzystano metodę ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) z detekcją kulochemiczną (Rycina 4.12 A-F). Wyniki przedstawiono także w postaci stosunku stężeń metabolitów i odpowiadających im analitów, by móc ocenić wpływ mutacji nie tylko na stężenie badanych neuroprzekaźników, ale również na ich metabolizm (tzw. obrót) (Rycina 4.12 G, H, I).

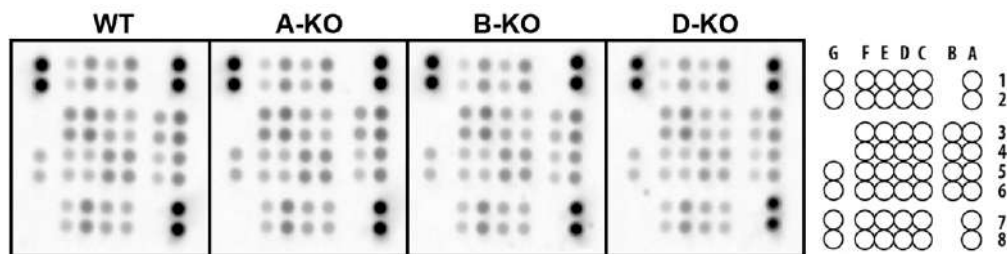
Na podstawie analizy otrzymanych wyników odnotowano wpływ delecji α_{1A} -AR, α_{1B} -AR lub α_{1D} -AR na poziom NA (efekt genotypu F(3, 26)=4,3404, p=0,01316), DA (efekt genotypu F(3, 24)=5,3497, p=0,00577) i 5-HT (efekt genotypu F(3, 24)=3,1527, p=0,04335) w HY myszy, w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej z osobników WT z poszczególnych hodowli linii transgeniczných (Rycina 4.12 A, B, C). Przy czym delecja jednego z podtypów α_1 -AR nie miała wpływu na poziom badanych metabolitów w tej strukturze mózgowej (Rycina 4.12 D, E, F). Wpływ mutacji odnotowano również w przypadku stosunku stężeń DOPAC i DA (efekt genotypu F(3, 24)=4,5336, p=0,01179) oraz 5-HIAA i 5-HT (efekt genotypu F(3, 23)=5,0017, p=0,00815) (Rycina 4.12 G, I).



Rycina 4.12: Poziom noradrenaliny (NA) (A), dopaminy (DA) (B), serotoniny (5-HT) (C), kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC) (D), kwasu homowanilinowego (HVA) (E) i kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) (F) oraz obrót DA (G, H) i 5-HT (I) w podwzgórzu myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 7-8$, analizowanych metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testem post-hoc Tukeya w wersji dla nierównolicznych grup (Unequal N HSD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.3.3 Ocena wpływu delecji podtypów α_1 -AR na ekspresję białek apoptotycznych

Ze względu na opisywane w literaturze różnice fenotypowe myszy wykazujących ogólnoustrojową nadekspresję podtypu α_{1A} i myszy wykazujących ogólnoustrojową nadekspresję podtypu α_{1B} (Rozdział 1.1.4), charakterystykę mysich linii transgeniczych A-KO, B-KO i D-KO uzupełniono o ocenę wpływu delecji poszczególnych podtypów α_1 -AR na ekspresję białek apoptotycznych w HIP. Przeprowadzono ją na podstawie oznaczeń wykonanych za pomocą macierzy białkowych zestawu Proteome Profiler Mouse Apoptosis Array Kit, w HIP samic (Rycina 4.13). Nazwy białek oraz ich koordynaty na macierzach zamieszczono w Tabeli 4.8.



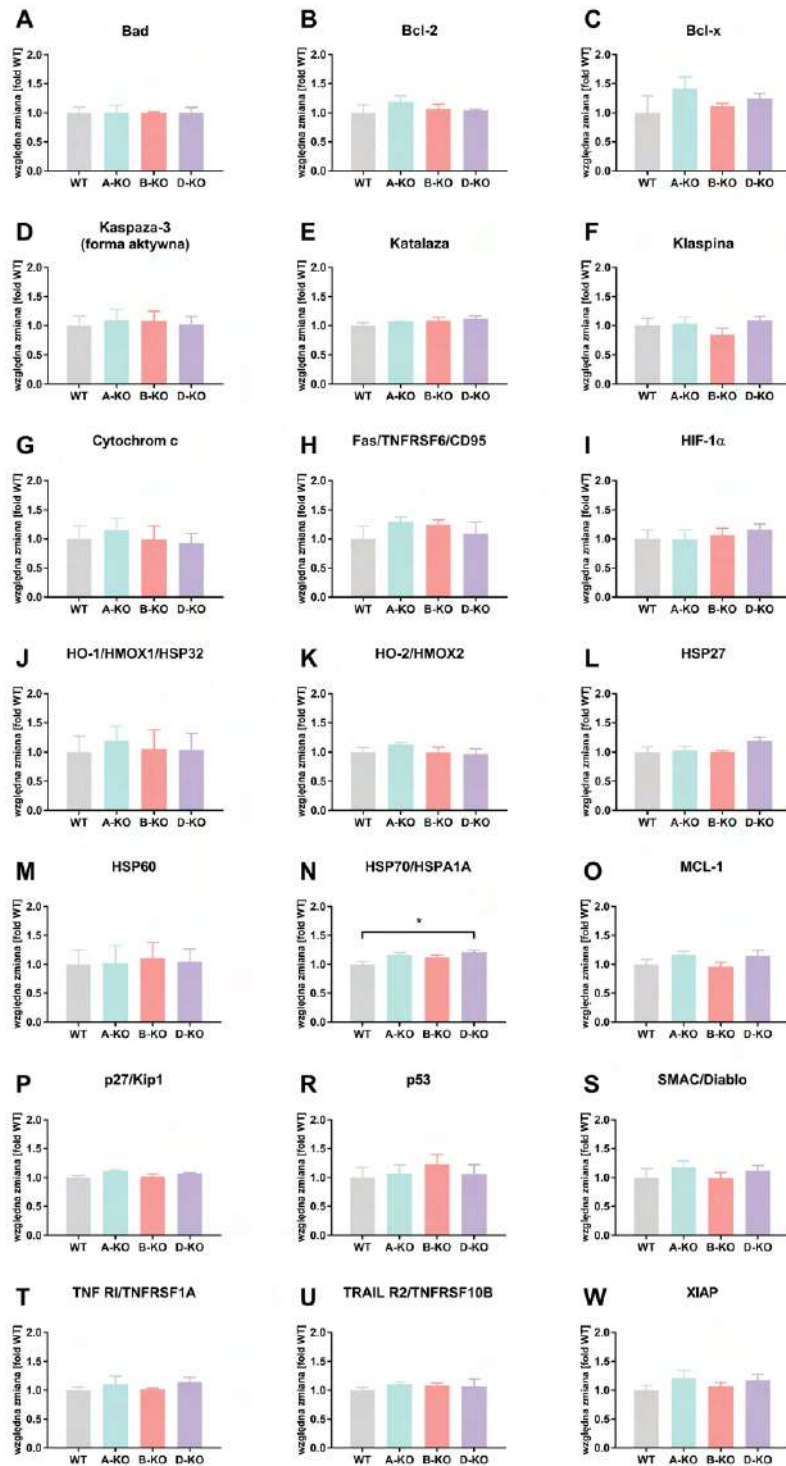
Rycina 4.13: Przykładowe obrazy białkowych macierzy apoptotycznych wykonanych na próbkach hipokampa myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Z prawej strony ryciny zamieszczono układ przeciwciał na macierzach, a nazwy rozpoznawanych przez nie białek i odpowiadające im koordynaty zestawiono w Tabeli 4.8.

Wykazano, że spośród badanych białek apoptotycznych delecja α_{1A} -AR, α_{1B} -AR lub α_{1D} -AR wpłynęła wyłącznie na ekspresję białka HSP70/HSPA1A (efekt genotypu $F(3, 8)=4,6907$, $p=0,03576$) (Rycina 4.14 N) i nie miała wpływu na ekspresję pozostałych badanych białek apoptotycznych w HIP myszy, w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej z osobników WT z poszczególnych hodowli linii transgeniczych (Rycina 4.14).

Tabela 4.8: Lista białek rozpoznawanych przez przeciwciała na macierzach apoptotycznych wraz z odpowiadającymi im koordynatami względem układu zamieszczonego na Rycinie 4.13.

Koordynaty	Białko	Koordynaty	Białko
A1, A2	punkty referencyjne	D7, D8	HSP27
A3, A4	Bad	E1, E2	HSP60
A5, A6	Bcl-2	E3, E4	HSP70/HSPA1A
A7, A8	punkty referencyjne	E5, E6	MCL-1
B3, B4	Bcl-x	E7, E8	p27/Kip1
B5, B6	Kaspaza-3 (forma aktywna)	F1, F2	p53
C1, C2	Katalaza	F3, F4	SMAC/Diablo
C3, C4	Klaspina	F5, F6	TNF RI/TNFRSF1A
C5, C6	Cytochrom c	F7, F8	TRAIL R2/TNFRSF10B
C7, C8	Fas/TNFRSF6/CD95	G1, G2	punkty referencyjne
D1, D2	HIF-1 α	G5, G6	XIAP
D3, D4	HO-1/HMOX1/HSP32	G7, G8	kontrola negatywna
D5, D6	HO-2/HMOX2		

4.3. MODELE *IN VIVO* - WERYFIKACJA I CHARAKTERYSTYKA



Rycina 4.14: Poziom ekspresji białek apoptotycznych w hipokampie myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 6$, analizowanych metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testem post-hoc Tukeya. * $p < 0.05$.

4.4 Modele *in vivo* - efekty leków przeciwdepresyjnych

W celu zbadania wpływu mutacji i wielokrotnego podawania leków przeciwdepresyjnych (LPD) zwierzęta z linii A-KO, B-KO i D-KO oraz odpowiadające tym liniom hodowlanym osobniki WT podzielono na grupy eksperymentalne, którym podawano 20 mg/kg chlorowodorek dezipraminy (DMI), 30 mg/kg chlorowodorek milnacipranu (MIL) lub roztwór soli fizjologicznej 0,9% NaCl (sal), w formie iniekcji dootrzewnowej (*i.p.*) raz dziennie przez 21 kolejnych dni. Podział na grupy eksperymentalne i liczebność zwierząt w poszczególnych grupach zamieszczono w Tabeli 3.7 w Rozdziale 3.2.5.

Następnie zbadano wpływ mutacji i wielokrotnego podawania DMI lub MIL na poziom mRNA podtypów α_1 -AR w korze przedczołowej (PFC) (Rozdział 4.4.1), profil ekspresji genów w hipokampie (HIP) (Rozdział 4.4.2), aktywację i ekspresję wybranych białek zaangażowanych w procesy wewnątrzkomórkowego przekazu sygnału w HIP (Rozdział 4.4.3) oraz poziomy wapnia (Ca), magnezu (Mg), miedzi (Cu) i cynku (Zn) we wzgórzu (TH) (Rozdział 4.4.4).

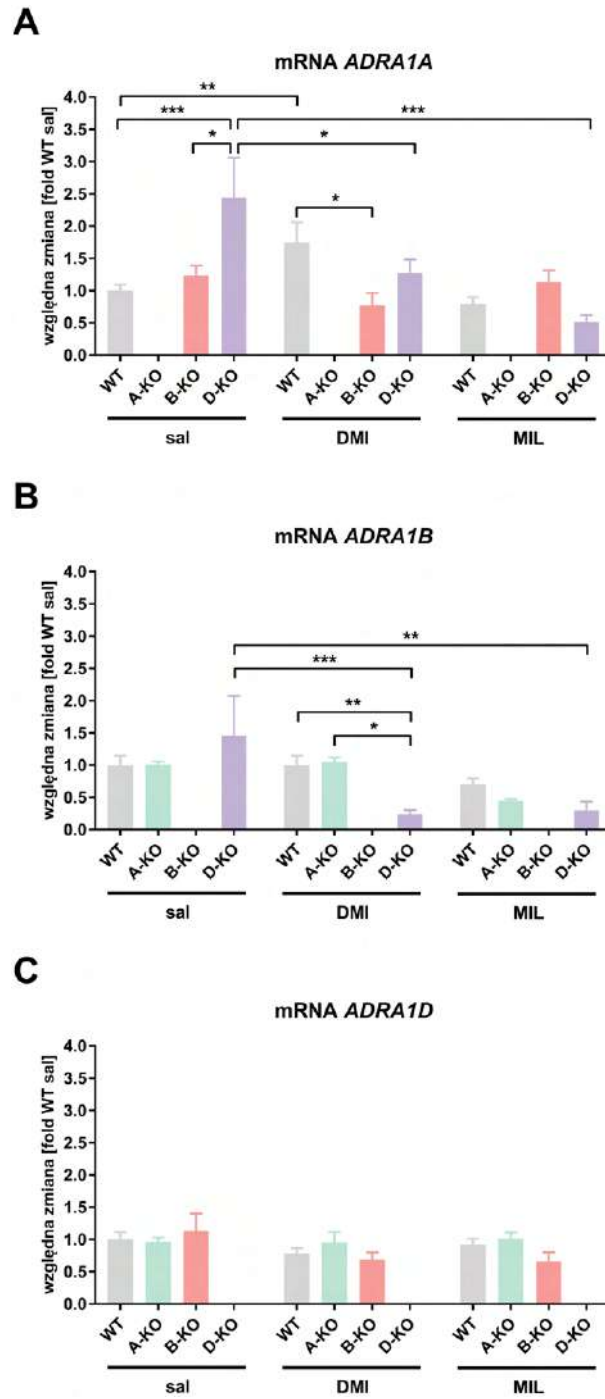
4.4.1 Wpływ delecji podtypów α_1 -AR i leków przeciwdepresyjnych na poziom mRNA pozostałych podtypów α_1 -AR

Badania mające na celu ocenę wpływu delecji α_{1A} -AR, α_{1B} -AR lub α_{1D} -AR i wielokrotnego podawania DMI lub MIL rozpoczęto od oznaczenia ekspresji na poziomie mRNA poszczególnych podtypów α_1 -AR w PFC samców. Poziom mRNA genów *ADRA1A*, *ADRA1B* i *ADRA1D* oznaczono za pomocą metody ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR).

Uzyskane wyniki wskazują na to, że w przypadku poziomów mRNA genu kodującego α_{1A} -AR (*ADRA1A*) i genu kodującego α_{1B} -AR (*ADRA1B*) delecja jednego z podtypów α_1 -AR i wielokrotne podawanie LPD wywołują zbliżone efekty (Rycina 4.15 A, B). Odnotowano, że na poziom mRNA tych genów wpływ miało samo działanie LPD (*ADRA1A*: efekt leków $F(2, 86)=4,258$, $p=0,0172$; *ADRA1B*: efekt leków $F(2, 88)=6,212$, $p=0,0030$) oraz mutacja w połączeniu z wielokrotnym podawaniem LPD (*ADRA1A*: efekt interakcji $F(4, 86)=4,713$, $p=0,0017$; *ADRA1B*:

efekt interakcji $F(4, 88)=2,870$, $p=0,0276$). Z kolei w przypadku genu kodującego α_{1D} -AR (*ADRA1D*) wykazano brak wpływu mutacji i/lub wielokrotnych podań LPD na jego ekspresję na poziomie mRNA w PFC myszy, w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej z osobników WT z poszczególnych hodowli linii transgenicznych (Rycina 4.15 C).

Dokonując bardziej szczegółowej analizy można zauważyć, że delecja podtypu α_{1A} u myszy A-KO nie wywołuje zmian ekspresji mRNA pozostałych podtypów α_1 -AR (α_{1B} i α_{1D}) w PFC, bez względu na to czy i jaki LPD otrzymywały zwierzęta. U myszy B-KO podania sal lub MIL nie wpłynęły na poziom ekspresji mRNA pozostałych podtypów α_1 -AR (α_{1A} i α_{1D}), natomiast wielokrotne podania DMI obniżyły poziom mRNA podtypu α_{1A} , nie wykazując wpływu na poziom mRNA podtypu α_{1D} . Obserwowana down-regulacja *ADRA1A* na skutek działania DMI u myszy B-KO jest po części związana z up-regulacją tego genu na skutek działania DMI u zwierząt WT. Efekty te sugerują, że delecja α_{1B} -AR uniemożliwia osiągnięcie efektu działania DMI, który jest widoczny u zwierząt WT. Z kolei u myszy D-KO już sama delecja podtypu α_{1D} zwiększyła ekspresję mRNA genu *ADRA1A*. Co więcej, u tych zwierząt wielokrotne podania LPD obniżają poziom mRNA pozostałych podtypów α_1 -AR (w tym przypadku α_{1A} i α_{1B}). Powyższe obserwacje zestawiono w Tabeli 4.9.



Rycina 4.15: Poziom mRNA genów *ADRA1A* (A), *ADRA1B* (B) i *ADRA1D* (D) w korze przedczołowej myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO), którym podawano sól fizjologiczną (sal), dezipraminę (DMI) lub milnacipran (MIL). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 6-7$, analizowanych metodą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testem post-hoc najmniejszych istotnych różnic (Fisher LSD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabela 4.9: Zmiany ekspresji genów *ADRA1A*, *ADRA1B* i *ADRA1D* w korze przedczołowej myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO), którym podawano sól fizjologiczną (sal), dezipraminę (DMI) lub milnacipran (MIL), w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej z osobników typu dzikiego (WT) z poszczególnych hodowli linii transgeniczných.

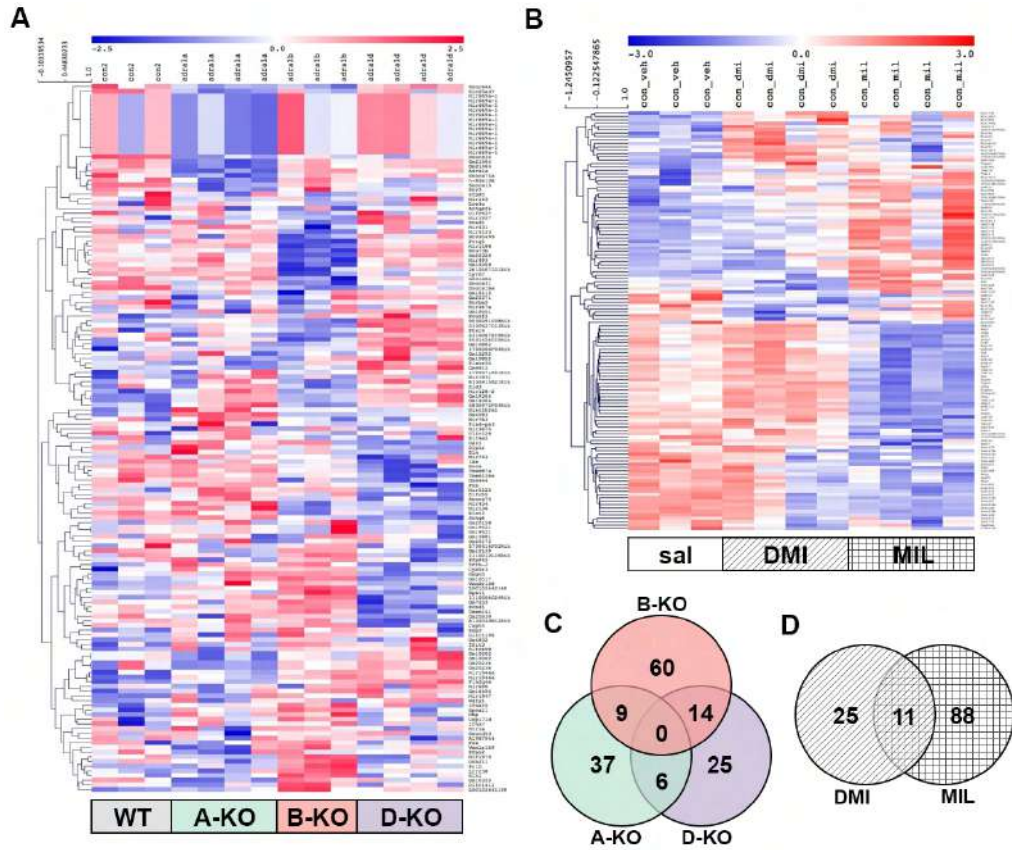
	sal	DMI	MIL
A-KO	— <i>ADRA1B</i> — <i>ADRA1D</i>	— <i>ADRA1B</i> — <i>ADRA1D</i>	— <i>ADRA1B</i> — <i>ADRA1D</i>
B-KO	— <i>ADRA1A</i> — <i>ADRA1D</i>	↓ <i>ADRA1A</i> # — <i>ADRA1D</i>	— <i>ADRA1A</i> — <i>ADRA1D</i>
D-KO	↑ <i>ADRA1A</i> *** — <i>ADRA1B</i>	↓ <i>ADRA1A</i> \$ ↓ <i>ADRA1B</i> ## \$\$\$	↓ <i>ADRA1A</i> \$\$\$ ↓ <i>ADRA1B</i> \$\$

*** $p < 0.001$ vs. WT sal, # $p < 0.05$ vs. WT DMI, ## $p < 0.01$ vs. WT DMI,

\$ $p < 0.05$ vs. D-KO sal, \$\$ $p < 0.01$ vs. D-KO sal, \$\$\$ $p < 0.001$ vs. D-KO sal.

4.4.2 Ocena wpływu delecji podtypów α_1 -AR i leków przeciwdepresyjnych na profil ekspresji genów

Wpływ mutacji i wielokrotnego podawania DMI lub MIL na profil ekspresji genów w HIP myszy A-KO, B-KO i D-KO zbadano wykorzystując metodę mikromacierzy DNA. Próbkę całkowitego RNA wyizolowanego z HIP samców poddano selekcji pod względem jakości i integralności materiału, a następnie użyto jako matrycy do syntezy cDNA w reakcji PCR z odwrotną transkrypcją. Otrzymane cDNA poddano hybrydyzacji do mikromacierzy GeneChip Mouse Genome 430A 2.0 (Affymetrix, USA). Macierze te zawierają ponad 45 000 sond oligonukleotydowych umożliwiających rozpoznanie ponad 39 000 transkryptów, a tym samym wykonanie profilowania ekspresji całego mysiego genomu. Otrzymane wyniki poddano analizie bioinformatycznej i przedstawiono w postaci map ciepłych (ang. *heatmaps*) wzorców ekspresji genów (Rycina 4.16).



Rycina 4.16: Mapy cieplne wzorców ekspresji genów w hipokampie myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO) (**A**) oraz myszy WT, którym podawano sól fizjologiczną (sal), dezipraminę (DMI) lub milnacipran (MIL) (**B**). Na diagramach Venna umieszczono liczbę transkryptów, których ekspresja uległa zmianie w sposób znamieny statystycznie, w zależności od genotypu myszy (**C**) lub podawanego leku przeciwdepresyjnego (**D**). Jako poziom istotności przyjęto kryteria $p < 0.05$ i $\text{fold} > 1.5$ ($\log_2$).

Na podstawie analizy otrzymanych wyników profilowania ekspresji genów odnotowano łącznie 151 transkryptów, których poziom uległ zmianie w sposób znamieny statystycznie, w wyniku delecji jednego z podtypów α_1 -AR. Na skutek delecji α_{1A} -AR lub α_{1D} -AR zmianom uległa porównywalna liczba transkryptów (52 u A-KO, 45 u D-KO), natomiast w przypadku delecji α_{1B} -AR transkryptów takich odnotowano niemal dwukrotnie więcej (83 u B-KO). Niektóre ze znamienie regulowanych transkryptów powtórzyły się u dwóch z trzech linii transgenicznych, przy czym nie odnotowano ani jednego transkryptu, który byłby znamienie regulowany zarówno u myszy A-KO, jak i B-KO oraz D-KO (Rycina 4.16 C). Co więcej, analiza wzorców ekspresji genów, które przedstawiono w postaci map cieplnych dzięki wykorzystaniu metod klasteryzacji, również wskazuje na odmienny profil ekspresji genów w HIP myszy B-KO w porównaniu do myszy A-KO i D-KO (Rycina 4.16 A).

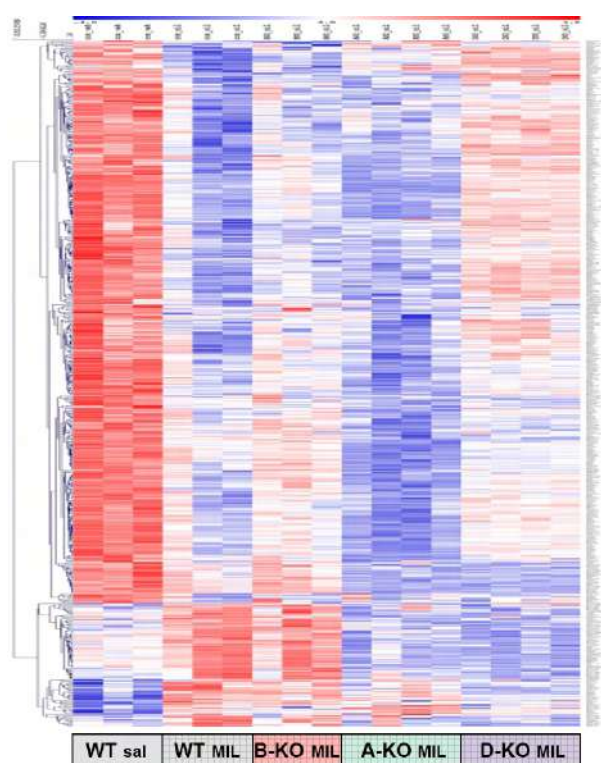
Wpływ wielokrotnych podań LPD na profil ekspresji genów w HIP myszy WT wykazano dla obu badanych LPD, przy czym efekt ten był wyraźnie większy w przypadku MIL (99 znamienie regulowanych transkryptów) niż DMI (36 znamienie regulowanych transkryptów). Podobnie jak w przypadku wpływu mutacji, odnotowano niewielką liczbę transkryptów, których poziom był regulowany przez oba LPD (Rycina 4.16 D). Analiza wzorców ekspresji genów również wskazuje na odmienny wpływ wielokrotnych podań DMI i MIL na profil ekspresji genów w HIP myszy WT (Rycina 4.16 B). Ponadto, dla transkryptów znamienie regulowanych w wyniku wielokrotnych podań MIL możliwe było wykonanie ontologicznej analizy genów, której wyniki przedstawiono na Rycinie 4.17.

ROZDZIAŁ 4. WYNIKI

	Mus musculus (REF)		upload 1 (▼ Hierarchy NEW! ?)				
GQ biological process complete	#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
ceramide biosynthetic process	45	8	1.08	7.44	+	2.95E-05	3.85E-02
↳ metabolic process	7166	227	171.31	1.33	+	6.30E-07	4.94E-03
↳ cellular metabolic process	6280	210	150.13	1.40	+	3.49E-08	5.48E-04
↳ membrane lipid biosynthetic process	106	12	2.53	4.74	+	2.10E-05	4.11E-02
oligodendrocyte differentiation	63	10	1.51	6.64	+	7.35E-06	2.31E-02
glycolipid metabolic process	80	10	1.91	5.23	+	4.75E-05	4.97E-02
cellular protein metabolic process	2859	103	68.35	1.51	+	2.76E-05	3.94E-02
positive regulation of metabolic process	3419	119	81.73	1.46	+	2.70E-05	4.23E-02
↳ positive regulation of biological process	5947	187	142.17	1.32	+	2.51E-05	4.37E-02
↳ regulation of metabolic process	5688	181	135.98	1.33	+	1.90E-05	4.26E-02
negative regulation of cellular process	4482	151	107.15	1.41	+	7.27E-06	2.85E-02
↳ negative regulation of biological process	5005	167	119.65	1.40	+	2.93E-06	1.53E-02
regulation of primary metabolic process	5098	166	121.87	1.36	+	1.47E-05	3.84E-02
regulation of nitrogen compound metabolic process	4952	160	118.38	1.35	+	3.86E-05	4.34E-02
regulation of cellular metabolic process	5288	169	126.41	1.34	+	3.72E-05	4.49E-02

Rycina 4.17: Wynik analizy ontologicznej transkryptów, których poziom w hipokampie myszy typu wild-type uległ zmianie w sposób znamieny statystycznie, w wyniku wielokrotnych podań milnacipranu. Analizę przeprowadzono przy użyciu metody Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) [Subramanian et al., 2005] i systemu klasyfikacji Panther [Mi et al., 2012].

Ze względu na wyraźnie większy efekt na poziomie transkryptomycznym wielokrotnych podań MIL w porównaniu do wielokrotnych podań DMI, wpływ delekcji poszczególnych podtypów α_1 -AR i działania LPD na profil ekspresji genów w HIP myszy zdecydowano przedstawić w niniejszej rozprawie na przykładzie wyników uzyskanych dla MIL (Rycina 4.18). Analiza wzorców ekspresji genów odpowiadających transkryptom znamiennie regulowanym w wyniku działania MIL u myszy WT oraz myszy WT, A-KO, B-KO i D-KO otrzymujących podania MIL wskazuje na zniesienie efektów działania leku na skutek delekcji α_{1D} -AR, przy czym zmiany te nie są obserwowane w przypadku delekcji α_{1A} -AR lub α_{1B} -AR. Ponadto, profil ekspresji genów w przypadku osobników B-KO MIL jest wyraźnie zbliżony do profilu ekspresji genów osobników WT MIL, co sugeruje, że na poziomie transkryptomicznym podtyp α_{1B} (w przeciwieństwie do podtypu α_{1D}), nie ma znaczenia dla efektów działania MIL, które są obserwowane u myszy WT MIL w porównaniu do myszy WT. Z kolei delekcja α_{1A} -AR wydaje się skutkować nasileniem efektów działania MIL obserwowanych u zwierząt WT MIL w porównaniu do zwierząt WT sal, jednak zmiany te nie są jednoznaczne.



Rycina 4.18: Mapa cieplna wzorców ekspresji genów w hipokampie myszy typu dzikiego (WT) oraz myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO), którym podawano sól fizjologiczną (sal) lub milnacipran (MIL).

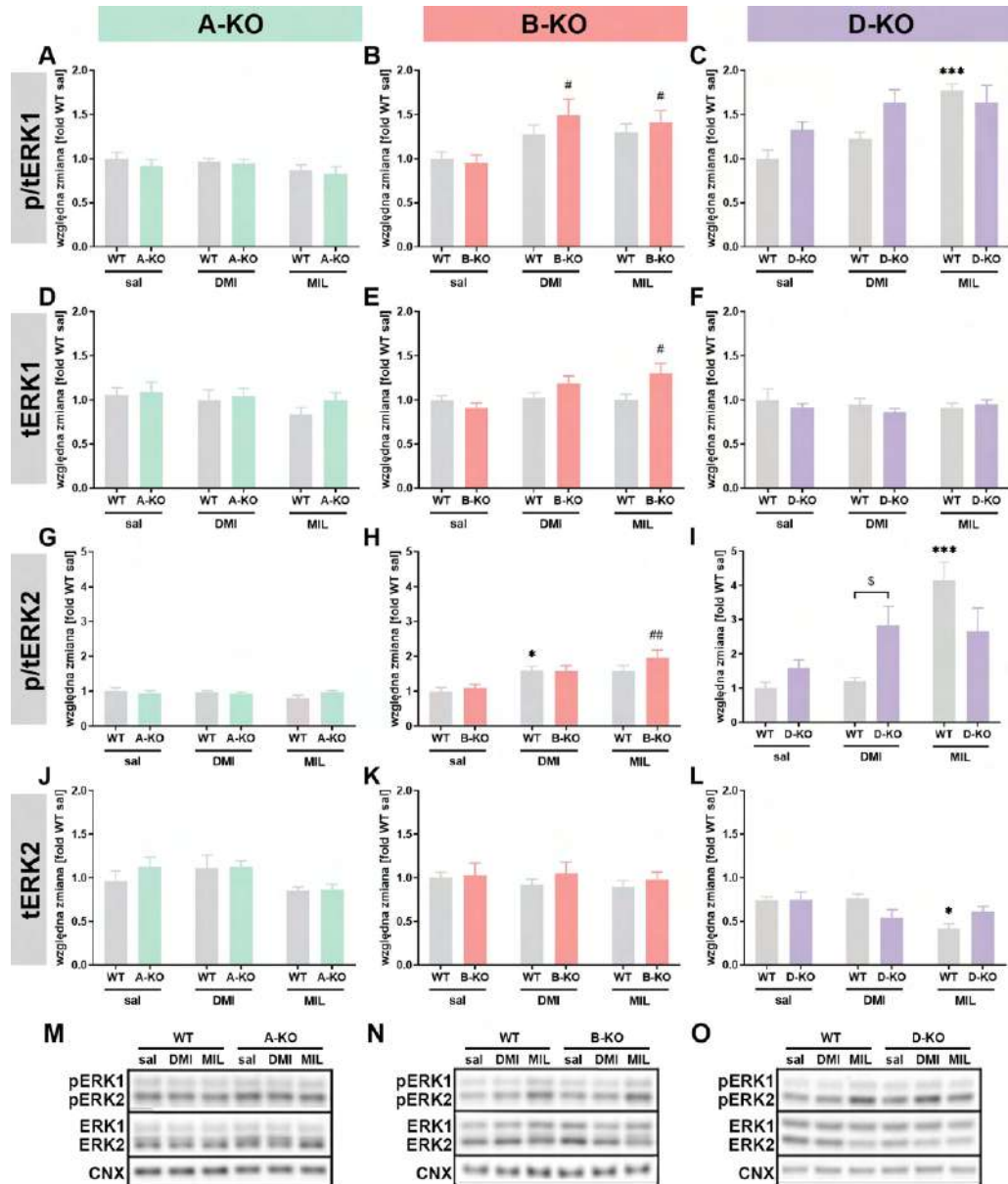
4.4.3 Ocena wpływu delecji podtypów α_1 -AR i leków przeciwdepresyjnych na ekspresję wybranych białek sygnałowych

W celu określenia wpływu mutacji i wielokrotnego podawania DMI lub MIL na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, oznaczono poziom fosorylacji i ekspresji szeregu białek zaangażowanych w przekaz sygnału pochodzący od α_1 -AR i/lub rozważanych w literaturze jako wewnątrzkomórkowe punkty uchwytu działania LPD (Rozdział 1.2.4) - w tym PKC, CaMKII, CREB, BDNF, TrkB, ERK1/2, Akt i GSK-3 β . Oznaczenia te wykonano za pomocą metody Western blot, zarówno w PFC, jak i HIP samców i samic myszy A-KO, B-KO i D-KO oraz osobników WT z poszczególnych hodowli linii transgeniczných. Z uwagi na obszerność wygenerowanych danych, w niniejszej pracy zdecydowano się zamieścić wyniki wyłącznie dla białek ERK1, ERK2, Akt i GSK-3 β z HIP samców i samic.

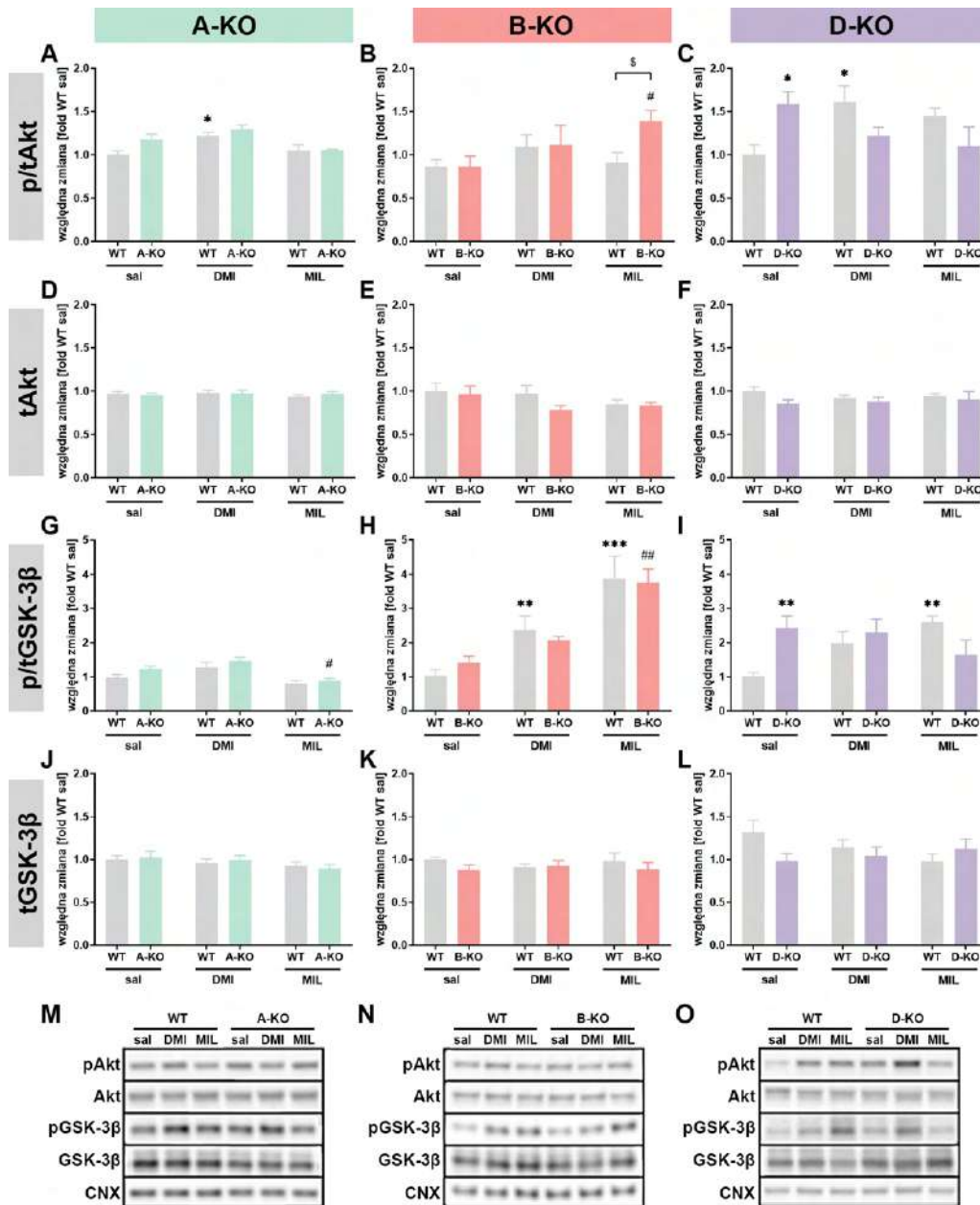
Na podstawie analizy otrzymanych wyników u **SAMCÓW** stwierdzono, że:

- selektywne unieczynnienie α_{1A} -**AR** nie wpłynęło na poziom ekspresji i fosorylacji białek ERK1, ERK2, Akt i GSK-3 β w porównaniu do zwierząt WT, co pozostało niezmiennie również po wielokrotnym podawaniu DMI lub MIL (Rycina 4.19 A, D, G, J, Rycina 4.20 A, D, G, J),
- podobnie, selektywne unieczynnienie α_{1B} -**AR** nie wpłynęło na poziom ekspresji białek ERK1, ERK2, Akt i GSK-3 β , natomiast w tym przypadku wielokrotne podawanie MIL nasiliło ekspresję ERK1 u myszy B-KO w porównaniu do osobników WT (efekt interakcji $F(1, 25)=6,4607$, $p=0,01760$) (Rycina 4.19 E, K, Rycina 4.20 E, K),
- przy czym selektywne unieczynnienie α_{1B} -**AR** nie wpłynęło również na fosorylację białek ERK1, ERK2 i GSK-3 β w porównaniu do zwierząt WT, co pozostało niezmiennie po wielokrotnym podawaniu DMI lub MIL (Rycina 4.19 B, H, Rycina 4.20 H),
- natomiast w przypadku białka Akt odnotowano, że wielokrotne podawanie MIL zwiększyło stosunek formy ufosforylowanej do totalnej (p/t) u myszy B-KO w porównaniu do osobników WT (efekt interakcji $F(1, 25)=4,5793$, $p=0,04231$) (Rycina 4.20 B),

- selektywne unieczynnienie α_{1D} -AR nie wpłynęło na poziom ekspresji białek ERK1, ERK2, Akt i GSK-3 β w porównaniu do zwierząt WT, co pozostało niezmiennie również po wielokrotnym podawaniu DMI lub MIL (Rycina 4.19 F, L, Rycina 4.20 F, L),
- selektywne unieczynnienie α_{1D} -AR wpłynęło jednak na fosforylację białek Akt i GSK-3 β zwiększając stosunek formy ufosforylowanej do totalnej (p/t) w porównaniu do zwierząt WT, przy czym dla obu białek wielokrotne podawanie MIL obniżyło p/t w porównaniu do zwierząt WT (p/tAkt: efekt interakcji F(1, 24)=11,309, p=0,00258; p/tGSK-3 β : efekt interakcji F(1, 22)=18,292, p=0,00031), a wielokrotne podawanie DMI obniżyło p/t w porównaniu do zwierząt WT tylko dla białka Akt (efekt interakcji F(1, 26)=12,740, p=0,00142) (Rycina 4.20 C, I),
- podobny efekt zaobserwowano w przypadku fosforylacji białek ERK1 i ERK2, gdzie również odnotowano obniżenie p/t u myszy D-KO w wyniku wielokrotnego podawania MIL (p/tERK1: efekt interakcji F(1, 24)=4,6700, p=0,04089; p/tERK2: efekt interakcji F(1, 24)=6,6086, p=0,01678), choć w tym przypadku odnotowano również nasilenie efektu samej mutacji, w postaci zwiększenia p/t, u myszy D-KO w wyniku wielokrotnego podawania DMI (p/tERK1: efekt genotypu F(1, 27)=12,000, p=0,00179; p/tERK2: efekt genotypu F(1, 26)=10,780, p=0,00293) (Rycina 4.19 C, I).



Rycina 4.19: Poziom fosforylacji i ekspresji białek ERK1 i ERK2 w hipokampie SAMCÓW myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 4-8$, analizowanych metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testem post-hoc Tukeya w wersji dla nierównolicznych grup (Unequal N HSD). * $p < 0.05$ vs. WT sal, *** $p < 0.001$ vs. WT sal, # $p < 0.05$ vs. KO sal, ## $p < 0.01$ vs. KO sal, \$ $p < 0.05$ vs. WT lek.

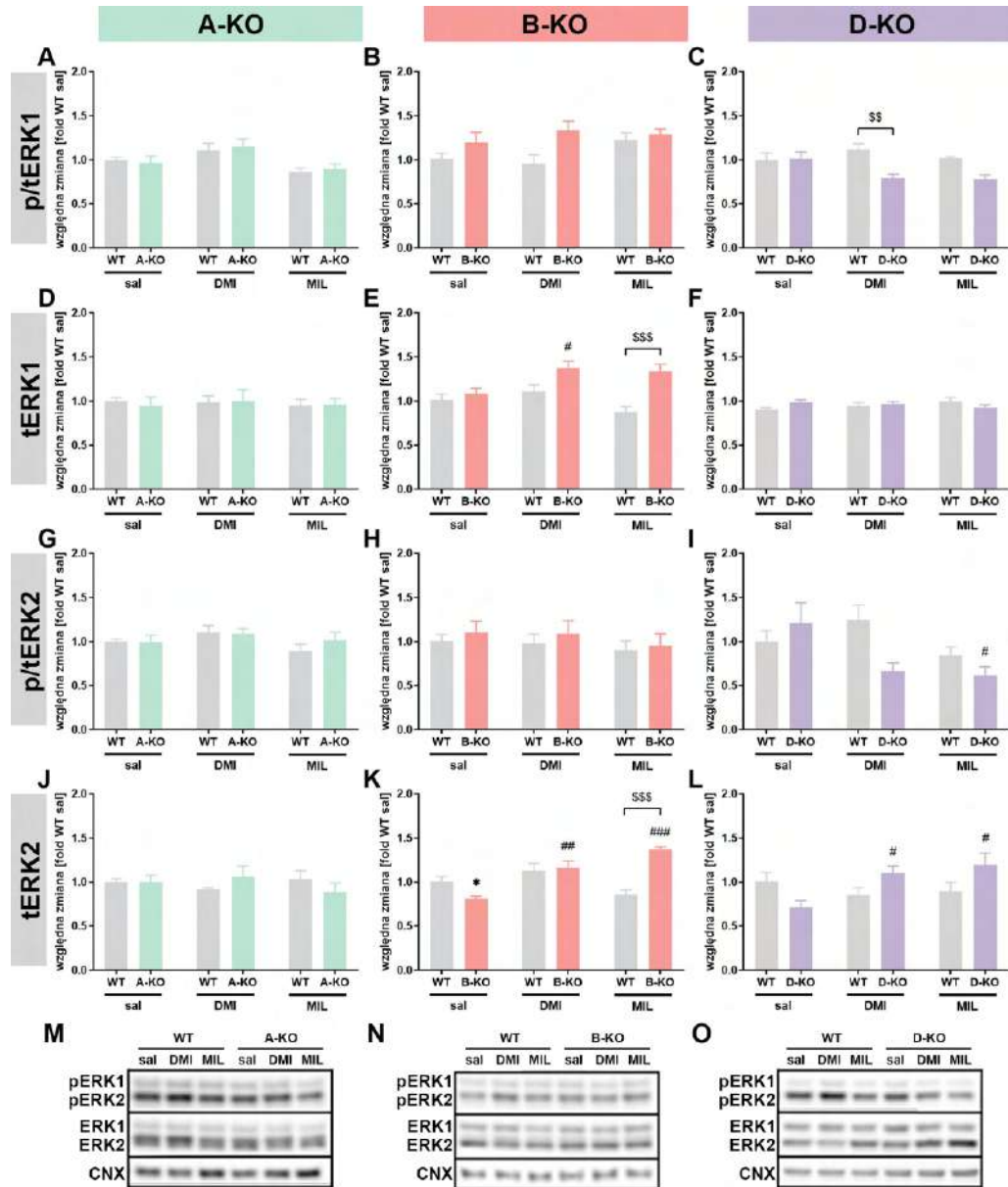


Rycina 4.20: Poziom fosforylacji i ekspresji białek Akt i GSK-3 β w hipokampie SAMCÓW myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z n = 4-8, analizowanych metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testem post-hoc Tukeya w wersji dla nierównolicznych grup (Unequal N HSD). * p < 0.05 vs. WT sal, ** p < 0.01 vs. WT sal, *** p < 0.001 vs. WT sal, # p < 0.05 vs. KO sal, ## p < 0.01 vs. KO sal, § p < 0.05 vs. WT lek.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników u **SAMIC** stwierdzono, że:

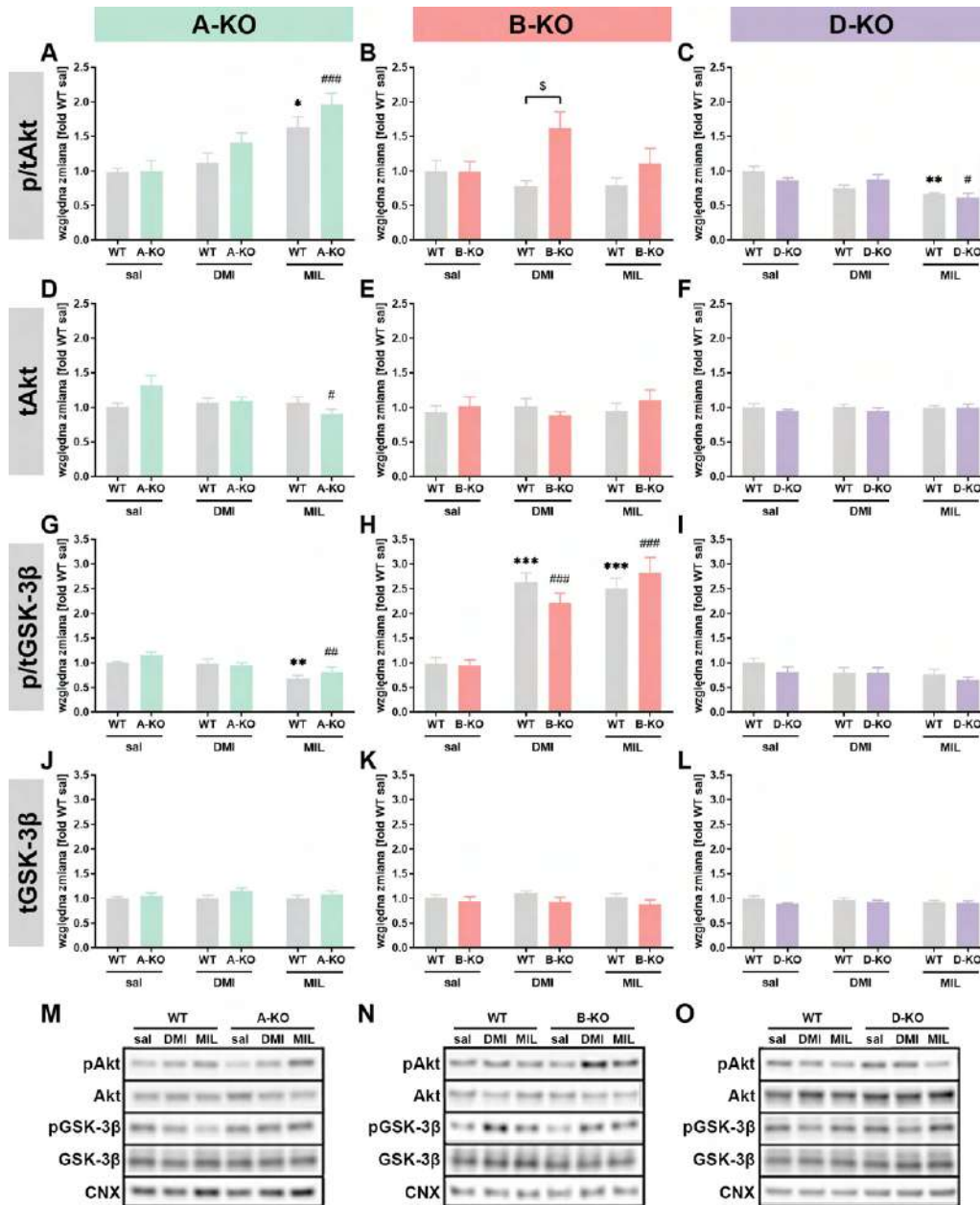
- selektywne unieczynnienie α_{1A} -**AR** nie wpłynęło na poziom ekspresji i fosforylacji białek ERK1, ERK2 i GSK-3 β w porównaniu do zwierząt WT, co pozostało niezmiennie również po wielokrotnym podawaniu DMI lub MIL (Rycina 4.21 A, D, G, J, Rycina 4.22 G, J),
- natomiast w przypadku białka Akt odnotowano osłabienie efektu samej mutacji i obniżenie jego ekspresji u myszy A-KO w wyniku wielokrotnego podawania MIL (efekt interakcji $F(1, 28)=6,9259$, $p=0,01366$) (Rycina 4.22 D),
- selektywne unieczynnienie α_{1B} -**AR** nie wpłynęło na poziom ekspresji białek Akt i GSK-3 β ani na fosforylację białka GSK-3 β w porównaniu do zwierząt WT, co pozostało niezmiennie również po wielokrotnym podawaniu DMI lub MIL (Rycina 4.22 E, K),
- przy czym w przypadku białka Akt odnotowano, że wielokrotne podawanie DMI zwiększyło stosunek formy ufosforylowanej do totalnej (p/t) u myszy B-KO w porównaniu do osobników WT (efekt interakcji $F(1, 25)=6,2888$, $p=0,01901$) (Rycina 4.22 B),
- z kolei dla białek ERK1 i ERK2 selektywne unieczynnienie α_{1B} -**AR** nie wpłynęło na ich fosforylację, ale na poziom ekspresji formy totalnej - w wyniku mutacji odnotowano obniżenie ekspresji ERK2 w porównaniu do zwierząt WT, a efekt ten jest niwelowany na skutek wielokrotnych podań DMI i odwracany na skutek wielokrotnego podawania MIL (efekt interakcji $F(1, 25)=58,117$, $p=0,00000$) (Rycina 4.21 K),
- podobny efekt zaobserwowano w przypadku poziomu ekspresji formy totalnej białka ERK1, gdzie również odnotowano jej zwiększenie u myszy D-KO w wyniku wielokrotnego podawania MIL (efekt interakcji $F(1, 27)=7,9829$, $p=0,00877$) (Rycina 4.21 E),
- podobnie, selektywne unieczynnienie α_{1D} -**AR** nie wpłynęło na poziom ekspresji białek Akt i GSK-3 β ani na fosforylację białka GSK-3 β w porównaniu do zwierząt WT, co pozostało niezmiennie również po wielokrotnym podawaniu DMI lub MIL (Rycina 4.22 F, L),

- i podobnie, w przypadku białka Akt odnotowano, że wielokrotne podawanie DMI zwiększyło stosunek formy ufosforylowanej do totalnej (p/t) u myszy D-KO w porównaniu do osobników WT (efekt interakcji $F(1, 26)=4,3157$, $p=0,04778$) (Rycina 4.22 C),
- i podobnie, w wyniku mutacji odnotowano obniżenie ekspresji ERK2 w porównaniu do zwierząt WT, a efekt ten jest odwracany na skutek wielokrotnego podawania DMI lub MIL (DMI: efekt interakcji $F(1, 26)=9,6884$, $p=0,00447$; MIL: efekt interakcji $F(1, 26)=7,6880$, $p=0,01014$) (Rycina 4.21 L),
- natomiast selektywne unieczynnienie α_{1D} -AR wpłynęło na fosforylację białek ERK1 i ERK2, gdzie odnotowano obniżenie p/t u myszy D-KO w wyniku wielokrotnego podawania DMI (p/tERK1: efekt genotypu $F(1, 27)=6,4779$, $p=0,01695$; p/tERK2: efekt genotypu $F(1, 27)=7,1601$, $p=0,01273$) (Rycina 4.21 C, I).



Rycina 4.21: Poziom fosforylacji i ekspresji białek ERK1 i ERK2 w hipokampie SAMIC myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 4-8$, analizowanych metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testem post-hoc Tukeya w wersji dla nierównolicznych grup (Unequal N HSD). * $p < 0.05$ vs. WT sal, # $p < 0.05$ vs. KO sal, ## $p < 0.01$ vs. KO sal, ### $p < 0.001$ vs. KO sal, \$ $p < 0.05$ vs. WT lek, \$\$ $p < 0.01$ vs. WT lek, \$\$\$ $p < 0.001$ vs. WT lek.

4.4. MODELE *IN VIVO* - EFEKTY LEKÓW PRZECIWDEPRESYJNYCH



Rycina 4.22: Poziom fosforylacji i ekspresji białek Akt i GSK-3 β w hipokampie SAMIC myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 4-8$, analizowanych metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testem post-hoc Tukeya w wersji dla nierównolicznych grup (Unequal N HSD). * $p < 0.05$ vs. WT sal, ** $p < 0.01$ vs. WT sal, *** $p < 0.001$ vs. WT sal, # $p < 0.05$ vs. KO sal, ## $p < 0.01$ vs. KO sal, ### $p < 0.001$ vs. KO sal, § $p < 0.05$ vs. WT lek.

4.4.4 Wpływ delecji podtypów α_1 -AR i leków przeciwdepresyjnych na poziomy wybranych pierwiastków

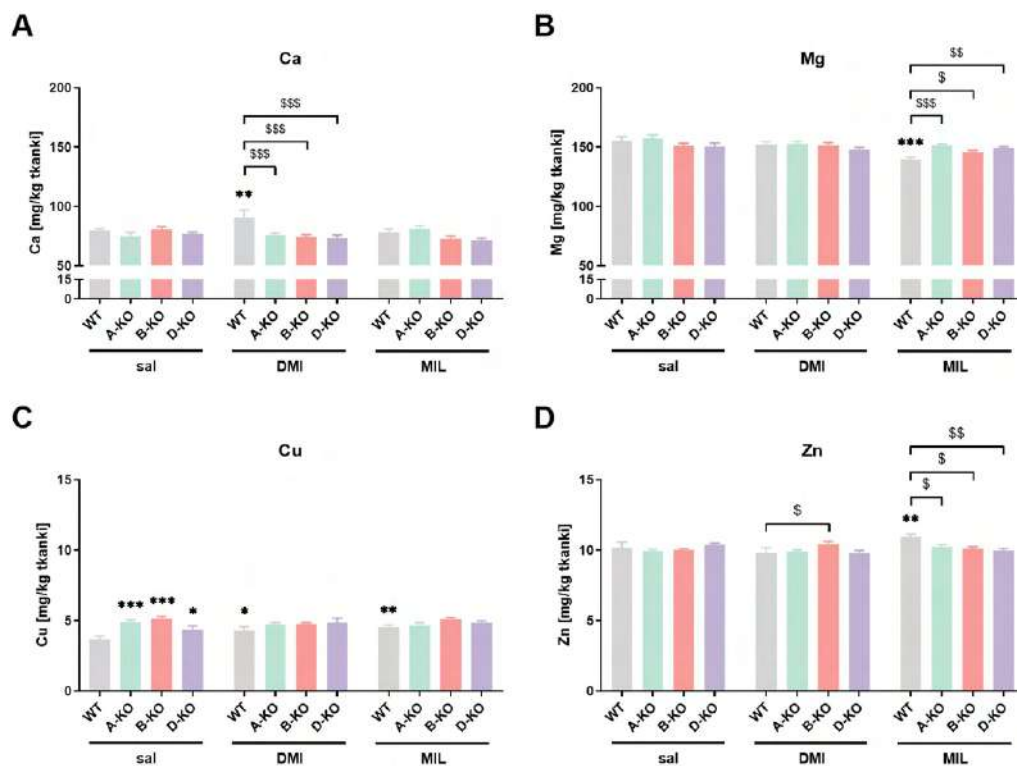
Ze względu na rosnącą liczbę doniesień na temat roli pierwiastków w farmakoterapii depresji (Rozdział 1.2.2) i ich bezpośredniego oddziaływania z α_1 -AR [Ciolek et al., 2011], badania wpływu delecji poszczególnych podtypów α_1 -AR i LPD uzupełniono o oznaczenia poziomu wapnia (Ca), magnezu (Mg), miedzi (Cu) i cynku (Zn) w TH samców (Rycina 4.23) i samic (Rycina 4.24), które wykonano z wykorzystaniem metody płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS, ang. *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*).

Wykazano, że na poziom Ca w TH samców wpływ miała zarówno sama mutacja (efekt genotypu: $F(3, 96)=2,74$, $p=0,0476$), jak i mutacja w połączeniu z wielokrotnym podawaniem LPD (efekt interakcji $F(6, 95)=2,70$, $p=0,0182$). U zwierząt tych zaobserwowano, że wielokrotne podania DMI zwiększyły tkankowy poziom Ca, a efekt ten był znoszony w wyniku delecji któregośkolwiek z podtypów α_1 -AR (Rycina 4.23 A). Podobnie u samic, na poziom Ca w TH wpływ miała sama mutacja (efekt genotypu $F(3, 93)=3,77$, $p=0,0133$), ale także wielokrotne podawanie LPD (efekt leków $F(2, 93)=7,97$, $p=0,0006$). W tym przypadku delecja α_{1B} -AR lub α_{1D} -AR zmniejsza tkankowy poziom Ca i podobny efekt odnotowano w wyniku wielokrotnych podań MIL u zwierząt WT (Rycina 4.24 A).

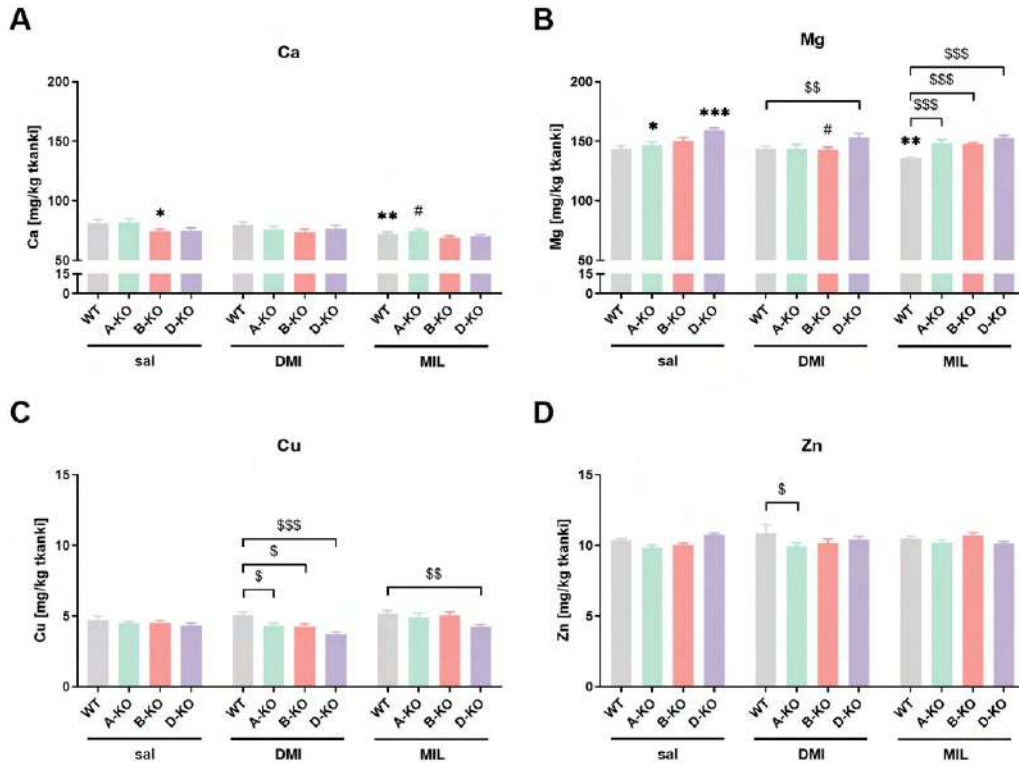
Z kolei na poziom Mg w TH samców wpływ miała zarówno sama mutacja (efekt genotypu: $F(3, 95)=5,03$, $p=0,0028$), jak i wielokrotne podawanie LPD (efekt leków $F(2, 96)=8,94$, $p=0,0003$) oraz mutacja w połączeniu z wielokrotnym podawaniem LPD (efekt interakcji $F(6, 96)=2,90$, $p=0,0122$). U zwierząt tych zaobserwowano, że wielokrotne podania MIL zmniejszyły tkankowy poziom Mg, a efekt ten był znoszony w wyniku delecji któregośkolwiek z podtypów α_1 -AR (Rycina 4.23 B). U samic, podobnie jak w przypadku Ca, na poziom Mg w TH wpływ miała sama mutacja (efekt genotypu $F(3, 95)=18,88$, $p=0,0000$), ale także wielokrotne podawanie LPD (efekt leków $F(2, 95)=3,60$, $p=0,0312$). Natomiast w tym przypadku delecja α_{1B} -AR lub α_{1D} -AR zwiększa (przeciwnie niż przy Ca) tkankowy poziom Mg i podobny efekt odnotowano w wyniku wielokrotnych podań DMI lub MIL, przy czym na skutek działania MIL efekt ten był silniejszy, gdyż lek ten zmniejszył poziom Mg u myszy WT (Rycina 4.24 B).

Wykazano, że na poziom Cu w TH samców wpływ miała wyłącznie sama mutacja (efekt genotypu $F(3, 96)=9,53$, $p=0,0000$). U zwierząt tych zaobserwowano, że delecja któregośkolwiek z podtypów α_1 -AR zwiększyła poziom Cu i podobny efekt odnotowano w wyniku wielokrotnych podań DMI lub MIL u zwierząt WT (Rycina 4.23 C). U samic, podobnie jak w przypadku Ca i Mg, na poziom Cu w TH wpływ miała sama mutacja (efekt genotypu $F(3, 95)=8,67$, $p=0,0000$), ale także wielokrotne podawanie LPD (efekt leków $F(2, 95)=5,09$, $p=0,0079$). W tym przypadku delecja któregośkolwiek z podtypów α_1 -AR zmniejszyła poziom Cu wyłącznie u zwierząt otrzymujących wielokrotne podania DMI, choć podobny efekt odnotowano w wyniku działania MIL u myszy D-KO (Rycina 4.24 C).

Z kolei na poziom Zn w TH samców wpływ miała wyłącznie mutacja w połączeniu z wielokrotnym podawaniem LPD (efekt interakcji $F(6, 96)=2,58$, $p=0,0231$). U zwierząt tych zaobserwowano podobne zmiany jak w przypadku Mg, jednak dla Zn miały one przeciwny kierunek. Odnotowano, że wielokrotne podania MIL zwiększyły (przeciwnie niż przy Mg) tkankowy poziom Zn, a efekt ten był znoszony w wyniku delecji któregośkolwiek z podtypów α_1 -AR (Rycina 4.23 D). U samic wykazano brak wpływu mutacji i/lub wielokrotnych podań LPD na poziom Zn w TH, w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej z osobników WT z poszczególnych hodowli linii transgeniczných.



Rycina 4.23: Poziom wapnia (Ca) (A), magnezu (Mg) (B), miedzi (Cu) (C) i cynku (Zn) (D) we wzgórzu SAMCÓW myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 7-8$, analizowanych metodą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i analizy kontrastów. * $p < 0.05$ vs. WT sal, ** $p < 0.01$ vs. WT sal, *** $p < 0.001$ vs. WT sal, $^{\$}$ $p < 0.05$ vs. WT lek, $^{\$\$}$ $p < 0.01$ vs. WT lek, $^{\$ \$ \$}$ $p < 0.001$ vs. WT lek.



Rycina 4.24: Poziom wapnia (Ca) (A), magnezu (Mg) (B), miedzi (Cu) (C) i cynku (Zn) (D) we wzgórzu SAMIC myszy typu dzikiego (WT) i myszy typu knockout z selektywnym unieczynnieniem receptora adrenergicznego α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Dane odpowiadają wartościom średnich $\pm$ SEM z $n = 7-8$, analizowanych metodą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i analizy kontrastów. * $p < 0.05$ vs. WT sal, ** $p < 0.01$ vs. WT sal, *** $p < 0.001$ vs. WT sal, # $p < 0.05$ vs. KO sal, \$ $p < 0.05$ vs. WT lek, \$\$ $p < 0.01$ vs. WT lek, \$\$\$ $p < 0.001$ vs. WT lek.

Rozdział 5

Dyskusja i wnioski

Nie ulega wątpliwości, że od początku historii farmakoterapii depresji działanie leków przeciwdepresyjnych (LPD) było i jest mediowane przez ich wpływ, bezpośredni lub pośredni, na elementy układu noradrenergicznego. Już w latach 90. XX wieku wykazano, że klinicznie istotne LPD mogą oddziaływać na receptory α_1 -adrenergiczne (α_1 -AR) w sposób antagonistyczny lub wpływać na siłę przekazywanego za ich pośrednictwem sygnału [Nalepa and Vetulani, 1991, Nalepa and Vetulani, 1993, Nalepa and Vetulani, 1994, Vetulani and Nalepa, 1996]. Wówczas jednak dostępne metody i narzędzia badawcze nie umożliwiały zdefiniowania tych efektów dla poszczególnych podtypów α_1 -AR. Dopiero rozwój technik klonowania molekularnego i wykorzystanie modeli zwierzęcych otrzymanych na drodze inżynierii genetycznej pozwoliło na zbadanie zróżnicowanego zaangażowania podtypów α_1 -AR w regulację behawioru [Nalepa et al., 2013]. Wyniki tych badań sugerowały, że α_1 -AR mogą mieć znaczenie nie tylko w kontekście skutków ubocznych działania LPD, ale również w modulowaniu ich efektu terapeutycznego. Jako że współczesna farmakoterapia depresji charakteryzuje się niedostateczną skutecznością i szybkością działania oraz obarczona jest uciążliwymi skutkami ubocznymi, niezbędne jest poszukiwanie nowych strategii farmakologicznych i punktów uchwytu LPD. Przyczynić się do tego może zdefiniowanie funkcjonalnego zróżnicowania podtypów α_1 -AR w efektach działania LPD, jednak ich badanie w OUN jest wciąż utrudnione z uwagi na brak wysoce specyficznych ligandów przenikających przez barierę krew-mózg. Z tego względu, w niniejszej rozprawie wykorzystano genetyczne modele *in vitro* i *in vivo*.

5.1 Modele *in vitro* - weryfikacja i charakterystyka

Do badań *in vitro* zaprojektowano i stworzono linie komórkowe ze stabilną ekspresją pojedynczego podtypu receptora adrenergicznego – α_{1A} (linia α_{1A} -AR) i α_{1B} (linia α_{1B} -AR). Na podstawie wyników testu redukcji resazuryny wykazano, że aktywność metaboliczna komórek z linii α_{1A} -AR i α_{1B} -AR nie odbiega od aktywności metabolicznej komórek kontrolnych. Oznacza to, że stabilna ekspresja α_{1A} -AR lub α_{1B} -AR nie zmienia aktywności metabolicznej komórek i nie powinna wpływać na wyniki oznaczeń zaplanowanych w kolejnych etapach eksperymentu. Ponadto, wartości EC_{50} wyznaczone na podstawie poziomu akumulacji fosforanu inozytolu (IP) wskazują na porównywalny poziom aktywacji wklonowanych receptorów w odpowiedzi na działanie znanych agonistów – noradrenaliny (NA) i fenylefryny. Podobnie, wartości IC_{50} wyznaczone na podstawie hamowania akumulacji IP wskazują na porównywalny poziom inhibicji podtypu α_{1A} w odpowiedzi na działanie NA przy obecności znanych antagonistów – prazosyny i WB4101. Natomiast dla podtypu α_{1B} odnotowano silniejszą inhibicję przy obecności prazosyny niż WB4101, co również było zgodne z przewidywaniami [Kenny et al., 1996, Nalepa et al., 2002, Kreiner et al., 2011, Coccurello et al., 2014]. Łącznie powyższe informacje pozwalają na uznanie wklonowanych receptorów jako funkcjonalne, a linie α_{1A} -AR i α_{1B} -AR jako przydatne do dalszych badań farmakologicznych.

W planie eksperymentu przewidziano również stworzenie linii komórkowej ze stabilną ekspresją α_{1D} -AR (linia α_{1D} -AR), jednak ze względu na niepowodzenia kolejnych podejmowanych prób, do dalszych badań zdecydowano się wykorzystać komercyjnie dostępną linię komórkową ChemiSCREENTM Ready-to-AssayTM α_{1D} Adrenergic Family Receptor Frozen Cells. Linia ta charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji ludzkiego α_{1D} -AR na powierzchni komórek i została stworzona ze szczególnym przeznaczeniem do oznaczeń wtórnych przekazników uwalnianych w odpowiedzi na stymulację tego receptora, co przesądziło przy jej wyborze jako linii najlepiej dopasowanej do zaplanowanego eksperymentu. Niestety, linia ChemiSCREENTM Ready-to-AssayTM α_{1D} została wyprowadzona z komórek Chem-1 (a nie PC12 jak linie α_{1A} -AR i α_{1B} -AR), która charakteryzuje się zwiększonym sprzężeniem receptorów metabotropowych ze ścieżką sygnalizacji wapniowej, co wymusiło oznaczanie poziomu jonów wapnia (Ca^{2+})

jako wtórnego przekaźnika aktywacji α_{1D} -AR. Inne tło genetyczne linii α_{1D} -AR i rodzaj oznaczanego wtórnego przekaźnika sprawia, że wyniki dla tej linii należy porównywać z wynikami dla linii α_{1A} -AR i α_{1B} -AR z zachowaniem należytej ostrożności.

Pomimo niepowodzeń przy tworzeniu linii komórkowej ze stabilną ekspresją funkcjonalnego α_{1D} -AR, nie zarzucono kolejnych prób wyeliminowania powyższego ograniczenia metodycznego. Możliwym powodem braku funkcjonalności tego podtypu α_1 -AR po wklonowaniu do komórek PC12 może być jego niewłaściwa lokalizacja. W literaturze istnieją doniesienia, że w warunkach nadekspresji α_{1D} -AR nie dociera prawidłowo do błony komórkowej, a jego umiejscowienie w niej jest zależne od procesu skrócenia N-końca (który jest prawdopodobnie fizjologicznym sposobem regulacji ekspresji α_{1D} -AR) i heterodimeryzacji z α_{1B} -AR [Hague et al., 2004a, Hague et al., 2004b, Kountz et al., 2016]. Co prawda w obszernej pracy Proudman et al. [Proudman et al., 2020] dotyczącej wiązania LPD i leków przeciwpsychotycznych z α_1 -AR autorzy wykorzystali α_{1D} -AR o pełnej długości, jednak jego ekspresja na powierzchni komórki była nawet 10-krotnie niższa niż ekspresja pozostałych podtypów. W przypadku niniejszej pracy i badań funkcjonalnych zdecydowano się wykorzystać komercyjnie dostępną linię komórkową, by uniknąć takiej sytuacji. Natomiast w celu weryfikacji hipotezy zakładającej nieprawidłową lokalizację podtypu α_{1D} po wklonowaniu do komórek PC12, w ramach stażu naukowego i współpracy z Instytutem Biotechnologii Uniwersytetu Helsińskiego stworzono piętnaście konstruktów, które posłużą do kolejnych prób stworzenia linii komórkowej ze stabilną ekspresją funkcjonalnego α_{1D} -AR.

W kolejnym kroku przeprowadzono charakterystykę linii α_{1A} -AR, α_{1B} -AR i α_{1D} -AR. Na podstawie analizy saturacyjnej wiązania radioliganda wykazano, że maksymalna liczba miejsc wiążących na powierzchni komórki (B_{max}) jest zbliżona dla wszystkich trzech linii komórkowych. Ponadto, wartości stałej dysocjacji (K_d) wskazują na wysokie powinowactwo wiązania radioliganda. Tym samym, powyższe informacje pozwalają na uznanie opisywanych modeli *in vitro* jako przydatne do dalszych badań farmakologicznych.

PODSUMOWANIE: Modele *in vitro* zweryfikowano pod kątem aktywności metabolicznej komórek i funkcjonalności podtypów α_1 -AR, a ich charakterystyka w postaci parametrów wiązania i gęstości na powierzchni komórki kwalifikuje je do kolejnego etapu eksperymentu.

5.2 Modele *in vitro* - efekty leków przeciwdopresyjnych

Następnie zbadano wpływ leków przeciwdopresyjnych (LPD) z różnych grup na podtypy α_1 -AR. W pierwszej kolejności komórki z linii α_{1A} -AR, α_{1B} -AR i α_{1D} -AR inkubowano przez 10 min z jednym LPD w zakresie różnych stężeń i w połowie tego czasu dodano NA w stężeniu dającym submaksymalną stymulację receptorów. Wartości IC_{50} wyznaczone na podstawie hamowania akumulacji wtórnych przekaźników (IP dla linii α_{1A} -AR i α_{1B} -AR lub Ca^{2+} dla linii α_{1D} -AR) wskazują, że imipramina (IMI), dezipramina (DMI) i mianseryna (MIA) hamowały aktywację wywołaną działaniem NA wszystkich trzech podtypów α_1 -AR. Przy czym dla IMI i DMI nasilenie tego efektu było zróżnicowane w zależności od podtypu α_1 -AR – IMI silniej hamowała aktywację podtypów α_{1A} i α_{1D} niż α_{1B} , a DMI silniej hamowała aktywację podtypu α_{1D} niż α_{1A} i α_{1B} . W przypadku IMI efekty te są spójne z wynikami Nojimoto et. al. [Nojimoto et al., 2010], którzy wykazali podobny profil działania również dla amitryptyliny i nortryptyliny. Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy uzupełniają tę wiedzę o kolejny lek z grupy TLPD – DMI, co sugeruje, że więcej leków z tej grupy może silnie hamować aktywację podtypów α_{1A} i α_{1D} i stosunkowo słabo hamować aktywację podtypu α_{1B} . Istotnie, w badaniach przesiewowych Proudman et al. [Proudman et al., 2020] wykazano, że z 11 leków z grupy TLPD, które uwzględniono w badaniu, wszystkie charakteryzowały się najsilniejszym powinowactwem do podtypu α_{1A} . Co więcej, odnotowano, że IMI silniej wiąże się z α_{1A} -AR niż DMI, co koresponduje z wartościami IC_{50} przedstawionymi w niniejszej pracy.

Wykazano również, że reboksetyna (REB) zmniejszyła aktywację wywołaną działaniem NA wyłącznie podtypu α_{1A} , a fluoksetyna (FLU) nie wpłynęła na poziom aktywacji żadnego z nich. Natomiast najciekawszy wynik otrzymano dla citalopramu (CIT), który wpłynął na aktywację wywołaną działaniem NA każdego

z podtypów α_1 -AR nieco inaczej – najsilniej hamował aktywację podtypu α_{1D} , słabiej hamował aktywację podtypu α_{1A} , a aktywację podtypu α_{1B} hamował wyłącznie w najwyższym badanym stężeniu. Efekty działania CIT na podtypy α_{1A} i α_{1B} są spójne z wynikami Proudman et al. [Proudman et al., 2020], niemniej jednak autorzy odnotowali słabsze hamowanie podtypu α_{1D} niż α_{1A} . Rozbieżność ta może wynikać z faktu, że w niniejszej pracy badano α_{1D} -AR o skróconym N-końcu, podczas gdy Proudman et al. wykorzystali do badań α_{1D} -AR o pełnej długości i stosunkowo niskim poziomie ekspresji.

W kolejnym kroku komórki z linii α_{1A} -AR, α_{1B} -AR i α_{1D} -AR preinkubowano przez 24 h lub 120 h z jednym LPD w stałym stężeniu, po tym czasie go odpłukano i dodano NA w zakresie różnych stężeń. Wartości EC_{50} i maksymalnej odpowiedzi (MAX) na działanie NA wyznaczone na podstawie poziomu akumulacji wtórnych przekazników (IP dla linii α_{1A} -AR i α_{1B} -AR lub Ca^{2+} dla linii α_{1D} -AR) wskazują, że ekspozycja przez 24 h na działanie IMI zwiększyła MAX wyłącznie podtypu α_{1B} , a przez 120 h zwiększyła dodatkowo MAX podtypu α_{1D} i obniżyła EC_{50} obu tych podtypów; ekspozycja przez 24 h na działanie DMI zwiększyła MAX podtypu α_{1B} i obniżyła EC_{50} podtypów α_{1A} i α_{1B} , a przez 120 h zwiększyła dodatkowo MAX α_{1D} i obniżyła EC_{50} wyłącznie podtypu α_{1B} ; ekspozycja przez 24 h na działanie MIA nie wpłynęła na MAX lub EC_{50} żadnego z podtypów, a przez 120 h zwiększyła MAX podtypów α_{1B} i α_{1D} oraz obniżyła EC_{50} podtypu α_{1D} ; ekspozycja przez 24 h lub 120 h na działanie CIT zwiększyła MAX podtypów α_{1A} i α_{1B} , natomiast ekspozycja przez 24 h lub 120 h na działanie REB lub FLU nie wpłynęła na MAX lub EC_{50} żadnego z podtypów.

Wszystkie powyżej opisane obserwacje zestawiono w Tabeli 5.1, by podkreślić jak wyniki tych dwóch eksperymentów o różnym schemacie postępowania wzajemnie się uzupełniają, dając pełniejszy obraz efektów LPD na podtypy α_1 -AR. Przykładowo, w pierwszym eksperymencie wykazano, że IMI silniej hamowała aktywację wywołaną działaniem NA podtypów α_{1A} i α_{1D} niż α_{1B} , co sugeruje nasilenie przekazu sygnału noradrenergicznego za pośrednictwem podtypu α_{1B} . Z kolei w drugim eksperymencie wykazano, że przy przedłużonej ekspozycji przez 24 h na działanie IMI dochodzi do zwiększenia maksymalnej odpowiedzi na działanie NA wyłącznie podtypu α_{1B} , co wskazuje na jeszcze większe nasilenie przekazu noradrenergicznego za pośrednictwem tego podtypu. Ponadto, efekty te nie były

Tabela 5.1: Zmiany obserwowane w eksperymentach oceniających efekty LPD na poszczególne podtypy α_1 -AR w modelach *in vitro* (w porównaniu do komórek kontrolnych).

	$\alpha 1A$ -AR	$\alpha 1B$ -AR	$\alpha 1D$ -AR
LPD	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
IMI	↓↓	↓	↓↓
DMI	↓	↓	↓↓
CIT	↓		↓↓
FLU			
REB	↓		
MIA	↓	↓	↓

24 h	$\alpha 1A$ -AR		$\alpha 1B$ -AR		$\alpha 1D$ -AR	
LPD	EC ₅₀	MAX	EC ₅₀	MAX	EC ₅₀	MAX
IMI				↑		
DMI	↓		↓	↑		
CIT		↑↑		↑		
FLU						
REB						
MIA						

120 h	$\alpha 1A$ -AR		$\alpha 1B$ -AR		$\alpha 1D$ -AR	
LPD	EC ₅₀	MAX	EC ₅₀	MAX	EC ₅₀	MAX
IMI			↓	↑	↓	↑
DMI			↓	↑↑		↑
CIT		↑↑		↑		
FLU						
REB						
MIA				↑	↓	↑

IMI - imipramina, DMI - dezipramina, CIT - citalopram, REB - reboksetyna,
MIA - mianseryna.

zależne od zmian w metabolizmie komórkowym, ponieważ nie odnotowano by którykolwiek z badanych LPD, bez względu na czas inkubacji, modulował aktywność metaboliczną komórek.

Analizując kolejność badanych LPD w zależności od nasilenia ich hamującego wpływu na poziom aktywacji wywołanej działaniem NA podtypów α_1 -AR stwierdzono, że największy efekt uzyskano w przypadku IMI, DMI i CIT. Zatem, zarówno w pierwszym, jak i drugim eksperymencie odnotowano zbliżone efekty dla IMI i DMI – leki te hamowały aktywację wywołaną działaniem NA wszystkich podtypów α_1 -AR, a przy przedłużonej ekspozycji przez 120 h zwiększały maksymalną odpowiedź na działanie NA podtypów α_{1B} i α_{1D} . Sugeruje to, że przy chronicznym stosowaniu IMI lub DMI dochodzi do nasilenia przekazu sygnału noradrenergicznego za pośrednictwem podtypów α_{1B} i częściowo również α_{1D} (przy czym przy tak długiej preinkubacji ich wrażliwość na działanie NA nieco się obniża). Nasilenie przekazu sygnału noradrenergicznego, w szczególności za pośrednictwem podtypu α_{1B} , w wyniku działania IMI zostało wykazane już przez Nojimoto et al. [Nojimoto et al., 2010]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają to spostrzeżenie, uzupełniają je o kolejny lek z grupy TLPD - DMI i sugerują, że efekt ten może być jeszcze silniejszy niż sądzono, z uwagi na zwiększenie maksymalnej odpowiedzi α_{1B} -AR na działanie NA.

Z kolei w przypadku CIT przedłużona ekspozycja przez 24 h i 120 h spowodowała nasilenie przekazu noradrenergicznego za pośrednictwem podtypów α_{1A} i częściowo również α_{1B} (przy braku wpływu na ich wrażliwość na działanie NA). Jest to spójne z poprzednimi badaniami przeprowadzonymi na próbkach tkanki mózgowej szczurów, w których obserwowano wzrost maksymalnej odpowiedzi α_1 -AR na działanie NA na skutek wielokrotnych podań CIT [Nalepa and Vetulani, 1993]. Ponadto, silniejszy efekt względem podtypu α_{1A} niż α_{1B} przy przedłużonej ekspozycji na działanie CIT koresponduje z wyznaczonymi wartościami IC_{50} , co sugeruje, że efekt ten jest zależny od bezpośredniego wpływu CIT na podtypy α_1 -AR.

PODSUMOWANIE: Modele *in vitro* poddano działaniu LPD z różnych grup i wykazano, że leki te mogą modulować funkcje α_1 -AR w sposób złożony i zależny od podtypu. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę podtypu α_{1B} w działaniu IMI i DMI oraz podtypów α_{1A} i α_{1B} w działaniu CIT.

5.3 Modele *in vivo* - weryfikacja i charakterystyka

Do badań *in vivo* wykorzystano trzy mysie linie transgeniczne typu knock-out z selektywnym unieczynnieniem jednego podtypu α_1 -AR - α_{1A} (A-KO), α_{1B} (B-KO) lub α_{1D} (D-KO). Wyprowadzono je z linii z mutacją wszystkich trzech podtypów α_1 -AR (ABD-KO), którą zweryfikowano pod kątem efektywności mutacji na podstawie badań autoradiograficznych skrawków mózgowych. W analizowanych strukturach nie odnotowano sygnału specyficznego wiązania radioliganda przez α_1 -AR, co potwierdza efektywność mutacji linii ABD-KO. Co więcej, nie wpłynęła ona na gęstość pozostałych typów AR - α_2 -AR i β -AR, co mogło by rzutować na wyniki oznaczeń zaplanowanych w kolejnych etapach eksperymentu.

Następnie zbadano wpływ mutacji A-KO, B-KO i D-KO na poziom wybranych neuroprzekaźników i ich metabolitów w mózgu. Wykazano, że unieczynnienie podtypu α_{1D} zmniejszyło stężenie NA w porównaniu do podtypu α_{1B} , którego mutacja, podobnie jak mutacja α_{1A} , nie wpłynęła na poziom NA w badanej strukturze mózgowej. Efekt ten nie był znamieny statystycznie względem zwierząt kontrolnych, niemniej jednak wskazuje na potencjalnie ważną rolę podtypu α_{1D} w transmisji noradrenergicznej w HY. Co więcej, może sugerować niewydolność mechanizmów adaptacyjnych w sytuacji braku funkcjonalnego α_{1D} -AR, co mogło by się wiązać z tym, że jako jedyny podtyp α_1 -AR wykazuje aktywność konstytutywną [García-Sáinz et al., 2010, Nalepa et al., 2013]. Idąc dalej, w pracy Konstandi et al. [Konstandi et al., 2000] wykazano wzrost stężenia NA w HY myszy w modelu stresu fizycznego, dlatego mutacja D-KO mogłaby wpływać nawet na funkcje osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) i zmniejszać podatność zwierząt na stres. Na tym etapie są to jednak daleko idące przypuszczenia, których potwierdzenie lub wykluczenie wymagałoby odpowiednio zaprojektowanych do tego celu badań. Odnotowano również wpływ unieczynnienia podtypu α_{1B} na stężenie i metabolizm DA i 5-HT w porównaniu do mutacji pozostałych podtypów α_1 -AR, jednak jak się

spodziewano w porównaniu do NA, której stężenie w HY było 3-5 razy większe niż DA lub 5-HT, efekt ten był marginalny.

Z uwagi na doniesienia literaturowe na temat skutków nadekspresji α_{1B} -AR u myszy w postaci wielonarządowej śmierci neuronów na drodze apoptozy [Zuscik et al., 2000] i hamowania procesów apoptozy w kardiomiocytach w wyniku aktywacji α_1 -AR [Zhu et al., 2000], a w szczególności za pośrednictwem α_{1A} -AR [Cotecchia et al., 2015, Yeh et al., 2017, Perez, 2021, Zhang et al., 2021], przy charakterystyce mysich linii A-KO, B-KO i D-KO uwzględniono również ocenę wpływu mutacji na ekspresję białek apoptotycznych w mózgu. Wykazano, że u myszy D-KO doszło do istotnego statystycznie wzrostu poziomu białka HSP70/HSPA1A w hipokampie (HIP), w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Białko to jest kluczowym elementem procesów regulujących odpowiedź komórki na czynniki stresujące, takie jak niedotlenienie, hiperglikemia, stres oksydacyjny, ekscytotoksyczność wywołana nadmiarem glutaminianu, stres psychofizjologiczny i inne [Daugaard et al., 2007]. Zmniejszenie aktywności białka HSP70/HSPA1A obserwowane jest wraz z wiekiem, a także w wielu chorobach neurodegeneracyjnych i nowotworowych, z kolei jego nadekspresja działa neuroprotekcynie i przeciwzapalnie w różnych modelach uszkodzeń mózgu [Turturici et al., 2011]. Co więcej, w badaniach na zwierzętach podawanie egzogenne białka HSP70 działa korzystnie zarówno w leczeniu urazów niedokrwienych mózgu [Shevtsov et al., 2014a, Shevtsov et al., 2014b], guzów mózgu [Shevtsov et al., 2014b], jak i w mysim modelu choroby Alzheimera [Bobkova et al., 2014], a nawet spowalnia procesy starzenia się komórek i poprawia funkcje poznawcze u starych myszy [Bobkova et al., 2015]. Wykazano również, że w HIP HSP70 pełni krytyczną rolę w mechanizmach konsolidacji pamięci [Porto et al., 2018]. Zatem można przypuszczać, że unieczynnienie α_{1D} -AR będzie miało korzystny wpływ na procesy regulujące odpowiedź neuronów na czynniki stresujące, co było by spójne z potencjalną mniejszą podatnością myszy D-KO na stres. Idąc dalej i uwzględniając fakt wysokiej ekspresji α_{1A} -AR w HIP [Perez, 2021] można domniemywać, że efekt ten wynika z kompensacji funkcji podtypu α_{1D} przez podtyp α_{1A} . Aczkolwiek ponownie, są to jedynie potencjalne hipotezy, których potwierdzenie lub wykluczenie wymagałoby oddzielnych badań. Natomiast wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na to, że unieczynnienie któregośkolwiek podtypu α_1 -AR

nie spowodowało zmian w procesach apoptozy w HIP myszy, które mogły by silnie wpływać na wyniki oznaczeń zaplanowanych w kolejnych etapach eksperymentu.

W planie eksperymentu przewidziano również zbadanie wpływu mutacji na ekspresję cytokin w korze przedczołowej (PFC) myszy A-KO, B-KO i D-KO. W tym celu wykonano wstępne oznaczenia z wykorzystaniem zestawu Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit (Bio-Techne, USA), jednak uzyskany sygnał był bliski sygnałowi tła, co uniemożliwiało jego zliczenie, dlatego wyników tych nie uwzględniono w niniejszej pracy. Warto jednak podkreślić, że dla kontroli pozytywnych uzyskano wyraźny, policzalny sygnał, co świadczy o poprawności wykonania oznaczenia i sugeruje, że unieczynnienie któregośkolwiek podtypu α_1 -AR nie spowodowało aktywacji procesów zapalnych w PFC myszy.

PODSUMOWANIE: Modele *in vivo* zweryfikowano pod kątem efektywności mutacji, a ich charakterystyka kwalifikuje je do kolejnego etapu eksperymentu. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę podtypu α_{1D} w transmisji noradrenergicznej w HY i procesach regulujących odpowiedź komórek na czynniki stresujące w HIP.

5.4 Modele *in vivo* - efekty leków przeciwdepresyjnych

Następnie, podobnie jak w przypadku modeli *in vitro*, zbadano efekty na poziomie wewnątrzkomórkowym wielokrotnego podawania LPD z różnych grup zwierzętom z linii A-KO, B-KO i D-KO. W oparciu o wyniki z części *in vitro*, w których największe zróżnicowanie względem podtypów α_1 -AR odnotowano w przypadku IMI, DMI i CIT, oraz wyniki wcześniejszych badań, w których mutacja w układzie noradrenergicznym spowodowała zmiany w układzie serotoninowym w mózgu myszy [Chmielarz et al., 2015], w tej części eksperymentu zdecydowano się zastosować LPD z dwóch grup. Spośród TLPD wybrano DMI, która jako amina drugorzędowa i metabolit ustrojowy IMI dużo silniej niż IMI hamuje wychwyt zwrotny NA w porównaniu do 5-HT, do tego stopnia, że pod tym względem można by ją było kwalifikować do grupy NRIs [Gillman, 2007]. Jako drugi lek wybrano milnacipran (MIL) należący do grupy SNRIs, który również hamuje wychwyt

zwrotny NA i 5-HT, jednak w przeciwieństwie do TLPD, wykazuje bardzo słabe działanie receptorowe [Maj et al., 2000, Puozzo et al., 2002].

Badania mające na celu ocenę wpływu mutacji i wielokrotnego podawania LPD rozpoczęto od oznaczenia ekspresji poszczególnych podtypów α_1 -AR w PFC myszy. Niestety próby zbadania ich ekspresji na poziomie białka skończyły się niepowodzeniem ze względu na niespecyficzność komercyjnie dostępnych przeciwciał. Co prawda problem ten był już wielokrotnie poruszany w literaturze [Jensen et al., 2009, Böhmer et al., 2014], jednak na rynku pojawiają się coraz to nowsze oferty firm produkujących przeciwciała, zapewniających o wyjątkowej specyficzności swoich produktów. Niestety, przetestowano kilka takich przeciwciał i przy ich użyciu obserwowano sygnał nawet w próbkach pochodzących od zwierząt ABD-KO, zatem ich wyjątkową specyficzność względem podtypów α_1 -AR uznano za wyjątkowo wątpliwą.

Wobec tego, ekspresję poszczególnych podtypów α_1 -AR w PFC myszy A-KO, B-KO i D-KO oznaczono na poziomie mRNA. Na tej podstawie wykazano, że unieczynnienie podtypu α_{1A} lub α_{1B} nie wywołało zmian ekspresji mRNA pozostałych podtypów α_1 -AR. Natomiast unieczynnienie podtypu α_{1D} spowodowało istotny statystycznie wzrost ekspresji mRNA genu kodującego podtyp α_{1A} . Ponownie, efekt ten sugeruje kompensację funkcji podtypu α_{1D} przez podtyp α_{1A} , w kolejnej strukturze mózgowej. Co ciekawe, u myszy D-KO odnotowano również wyraźny spadek ekspresji mRNA genów kodujących podtypy α_{1A} i α_{1B} na skutek wielokrotnego podawania LPD. Jednocześnie, u myszy A-KO i B-KO wielokrotne podawanie LPD nie wpłynęło na ekspresję mRNA genu kodującego podtyp α_{1D} . Łącznie pozwala to sądzić, że w efektach działania badanych LPD na α_1 -AR szczególną rolę odgrywa α_{1D} -AR. Ponadto odnotowano, że unieczynnienie α_{1B} uniemożliwia osiągnięcie efektu działania DMI, który jest widoczny u zwierząt WT, co koresponduje z wynikami z części *in vitro*, które wskazywały na istotną rolę podtypu α_{1B} w działaniu tego leku. Wyniki uzyskane w tej części eksperymentu stanowią również dodatkowe potwierdzenie efektywności mutacji modeli *in vivo*.

W kolejnym kroku, pozostając na poziomie transkryptomycznym, przeprowadzono profilowanie ekspresji genów w HIP myszy A-KO, B-KO i D-KO. Oceniono, że zarówno mutacja jak i wielokrotne podawanie LPD w bardzo umiarkowanym stopniu wpłynęły na profil ekspresji genów, gdyż istotne statystycznie

zmiany odnotowano w stosunkowo niewielkiej liczbie transkryptów. Co więcej, żaden z nich nie był regulowany u wszystkich trzech linii transgenicznych i tylko pojedyncze transkrypty były regulowane u dwóch z nich. Wraz z faktem, że u myszy B-KO zaobserwowano odmienny profil ekspresji genów w porównaniu do myszy A-KO i D-KO, w pewien sposób potwierdza to zróżnicowanie podtypów α_1 -AR. Szczególnie interesujący wynik otrzymano natomiast analizując efekty wielokrotnego podawania MIL u zwierząt D-KO. Ontologiczna analiza transkryptów znamienne regulowanych w HIP w wyniku działania MIL wykazała ich zaangażowanie w procesy biosyntezy ceramidów, różnicowania oligodendrocytów i metabolizmu glikolipidów. Procesy te są ze sobą ściśle powiązane, gdyż ceramidy pośredniczą w organizacji tratw lipidowych w błonie komórkowej, których składnikiem są m.in. glikolipidy, spośród których glukolipidy pełnią krytyczną rolę w różnicowaniu oligodendrocytów. Z kolei dojrzałe oligodendrocyty w ośrodkowym układzie nerwowym wytwarzają osłonkę mielinową wokół aksonów neuronów, a tratwy lipidowe pośredniczą w interakcji między glikoproteiną związaną z mieliną (MAG) z jej receptorem na neuronach. W neuronach natomiast, tratwy lipidowe odgrywają istotną rolę w modulowaniu kanałów jonowych i receptorów neuroprzekazników oraz w procesie uwalniania neuroprzekazników na drodze egzocytozy [Jana et al., 2009]. Zaangażowanie sfingomielinowego szlaku przekazywania sygnału, w którym diacyloglicerol (DAG) stymuluje hydrolizę sfingomieliny do ceramidu, zostało już niejednokrotnie wykazane w działaniu LPD [Kornhuber et al., 2009, Gulbins et al., 2013, Kornhuber et al., 2014, Gulbins et al., 2015, Dinoff et al., 2017, Chen et al., 2021, Schumacher et al., 2022], jednak uzyskane wyniki uzupełniają tę wiedzę o kolejny lek - MIL. Ponadto, na podstawie analizy wzorców ekspresji genów odpowiadających transkryptom znamienne regulowanym w HIP myszy A-KO, B-KO i D-KO na skutek wielokrotnych podań MIL wykazano, że unieczynnienie α_{1D} -AR znosi efekty działania tego leku, co ponownie wskazuje na istotną rolę tego podtypu α_1 -AR w działaniu MIL.

Oznaczenia wykonane w tej samej strukturze mózgowej u tych samych osobników, ale na poziomie ekspresji białek i ich fosforylacji również wykazały zaangażowanie podtypu α_{1D} w działaniu MIL. Na szczególną uwagę zasługują wyniki dotyczące białka GSK-3 β , które jest szeroko badane w kontekście depresji, a najnowsze doniesienia sugerują, że pełni kluczową rolę w etiologii i farmakoterapii tej

choroby [Duda et al., 2020]. Przez ostatnie lata wielokrotnie wykazano, że zarówno chroniczny stres jak i LPD wpływają na aktywność GSK-3 β w HIP [Silva et al., 2008, Okamoto et al., 2010, Beurel et al., 2011, Pardo et al., 2016, Inkster et al., 2018]. Co więcej, wyciszenie ekspresji GSK-3 β wyłącznie w HIP jest wystarczające do wywołania efektu przeciwdepresyjnego w testach behawioralnych u myszy, które poddano chronicznemu stresowi [Omata et al., 2011]. Białko GSK-3 β jest elementem wielu szlaków komórkowych, a jego aktywność może być regulowana przez wiele kinaz, m.in. Akt i ERK1/2, które poprzez fosforylowanie reszty serynowej (Ser9) białka GSK-3 β wywołują jego inhibicję. W niniejszej pracy wykazano, że unieczynnienie α_{1D} -AR spowodowało wzrost fosforylacji GSK-3 β , a zatem jego inhibicję, oraz wzrost fosforylacji Akt, czyli jego aktywację. Odnotowano również wzrost fosforylacji ERK1 i ERK2, a zatem ich aktywację, jednak był on wyraźnie słabszy. Analogiczne zmiany aktywności białek GSK-3 β , Akt i ERK odnotowano już wcześniej w badaniach na zwierzętach - w modelach chronicznego stresu obserwowano aktywację GSK-3 β oraz inhibicję Akt i ERK, natomiast na skutek działania LPD z różnych grup obserwowano inhibicję GSK-3 β oraz aktywację Akt i ERK [Marsden, 2013]. Jako, że inhibicja GSK-3 β wiąże się z efektem przeciwdepresyjnym, uzyskane wyniki ponownie skłaniają ku przypuszczeniu, że efekt ten wynika z kompensacji funkcji podtypu α_{1D} przez podtyp α_{1A} . Zweryfikowanie tej hipotezy, np. z wykorzystaniem linii transgenicznej z unieczynnieniem dwóch podtypów α_1 -AR - α_{1B} i α_{1D} (BD-KO), było by szczególnie ciekawym kierunkiem badań w kontekście najnowszych doniesień wskazujących na zaangażowanie białka GSK-3 β w regulację α_{1A} -AR [Alcántara-Hernández et al., 2020]. Ponadto wykazano, że unieczynnienie α_{1D} -AR znosi hamujący efekt działania MIL na GSK-3 β w HIP, co jest spójne z wynikami profilowania ekspresji genów. W tym przypadku jednak spadkowi fosforylacji GSK-3 β towarzyszył wyraźny spadek fosforylacji ERK2 i słaby spadek fosforylacji Akt, jak gdyby wielokrotne podawanie MIL spowodowało przełączenie udziału tych dwóch ścieżek sygnałowych. Co więcej, podobne zmiany aktywności białek GSK-3 β , Akt i ERK obserwowane są w wyniku akumulacji ceramidów i wiążą się ze śmiercią neuronów na drodze apoptozy [Arboleda et al., 2010, Jazvinščak Jembrek et al., 2015, Wang et al., 2021].

Wyniki uzyskane na tym etapie uwydatniają również zróżnicowanie między

podtypami α_1 -AR, gdyż unieczynnienie α_{1A} -AR lub α_{1B} -AR, w przeciwieństwie do α_{1D} -AR, nie spowodowało zmian aktywności powyższych białek oraz wpływ mutacji na efekty działania MIL obserwowano także u zwierząt B-KO, ale inny niż u D-KO, w postaci wzrostu aktywacji Akt i ekspresji ERK1. Ponadto, niniejsze wyniki podkreślają wagę pewnego aspektu metodologicznego, który jest coraz częściej poruszany w literaturze w kontekście etiologii i farmakoterapii chorób psychicznych, a są nim różnice międzypłciowe [LeGates et al., 2019, Kokras et al., 2019, Pavlidi et al., 2021, Bangasser and Cuarenta, 2021, Sramek et al., 2022, Pavlidi et al., 2022]. Okazuje się bowiem, że podczas gdy u samców myszy D-KO w przeważającej części wyników obserwowano wpływ mutacji na efekty działania MIL, u samic myszy D-KO wpływ mutacji odnotowano głównie w przypadku DMI. Co więcej, profil zmian aktywności badanych białek u samic także był inny, gdyż u nich unieczynnienie α_{1D} -AR nie spowodowało zmian aktywacji GSK-3 β i Akt, za to zmniejszyło aktywację ERK1 i ERK2. Zatem w HIP samic D-KO wielokrotne podawanie DMI wywołało wręcz odwrotny efekt niż wielokrotne podawanie MIL w tej samej strukturze u samców D-KO. Stanowi to zupełnie nową obserwację na tle dotychczas opublikowanych badań na temat różnic międzypłciowych w działaniu DMI, które ograniczają się wyłącznie do jednej płci lub efektów jednorazowego podania leku [Filip et al., 1989, Simpson et al., 2012, Shah and Frazer, 2014]. W literaturze pod tym względem wyróżnia się jedynie najnowsze badanie przeprowadzone w HIP szczurów, które sugeruje, że za efekt terapeutyczny DMI u samców i samic mogą odpowiadać różne mechanizmy molekularne [Ledesma-Corvi and García-Fuster, 2022]. W przypadku MIL liczba doniesień poruszających temat różnic międzypłciowych w jego działaniu jest jeszcze mniejsza [Morishita and Arita, 2003, Naito et al., 2007], aczkolwiek wykazano je dla innych leków z grupy SNRIs [Xing et al., 2013, Gray and Hughes, 2015, Xu et al., 2017]. W tym miejscu pojawia się też kolejny potencjalny kierunek badań, jak np. badania behawioralne myszy A-KO, B-KO i D-KO obu płci, gdyż najnowsze badanie z wykorzystaniem związków wpływających na transmisję noradrenergiczną sugerują, że za różnice międzypłciowe w noradrenergicznej modulacji uwagi i impulsywności odpowiadają α_1 -AR [Mei et al., 2021].

W ostatnim etapie badania efektów unieczynnienia jednego z podtypów α_1 -AR i wielokrotnego podawania DMI lub MIL uzupełniono o oznaczenie w mózgu po-

ziomu pierwiastków, których zaangażowanie w etiologię i farmakoterapię depresji wykazano w literaturze [Poleszak et al., 2005, Siwek et al., 2005, Galeotti et al., 2006, Siwek et al., 2009]. Na podstawie tych oznaczeń odnotowano, że unieczynnienie któregośkolwiek z podtypów α_1 -AR spowodowało wzrost poziomu Cu w TH, przy jednoczesnym braku wpływu na poziom Zn w tej strukturze mózgowej. Takie zaburzenie równowagi między Cu i Zn jest obserwowane w surowicy pacjentów chorujących na depresję [Russo, 2011], wraz ze zwiększeniem stężenia Cu/Zn SOD (SOD-1) w surowicy [Russo, 2010] oraz nasileniem efektów farmakoterapii przy suplementacji Zn [da Silva et al., 2021]. Co więcej, zwiększony stosunek stężeń Cu/Zn w surowicy wydaje się negatywnie korelować z poziomem metabolizmu neuronów w mózgu pacjentów [Liu et al., 2020]. Zatem unieczynnienie któregośkolwiek z podtypów α_1 -AR zwiększa stosunek stężeń Cu/Zn w TH, co może wpływać na procesy metaboliczne i antyoksydacyjne w tej strukturze mózgowej. Jednak potwierdzenie lub odrzucenie tej hipotezy wymagałoby przeprowadzenia odpowiednio zaprojektowanych do tego celu badań, które pozwoliłyby ocenić na ile obserwowane różnice stężeń pierwiastków mogą wpływać na powyższe procesy wewnątrzkomórkowe. Ponadto, wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że unieczynnienie któregośkolwiek z podtypów α_1 -AR znosi efekt działania MIL na poziom Zn i Mg oraz efekt działania DMI na poziom Ca w TH myszy, co podkreśla rolę α_1 -AR w działaniu tych LPD, jednak w sposób niezależny od podtypu.

Uzyskane wyniki podkreślają też, ponownie, wagę uwzględniania w badaniach obu płci, gdyż w tej samej strukturze mózgowej u samic nie odnotowano wpływu genotypu na efekty działania LPD na poziom żadnego z badanych pierwiastków. Co więcej, podczas gdy u samców najbardziej interesujące wyniki obserwowano w przypadku Cu i Zn, u samic wyniki te dotyczyły Ca i Mg. Okazało się bowiem, że u samic unieczynnienie α_{1B} -AR lub α_{1D} -AR obniżyło poziom Ca w TH, przy jednoczesnym zwiększeniu poziomu Mg w tej strukturze mózgowej. Takie zaburzenie równowagi między Ca i Mg jest obserwowane u pacjentów chorujących na depresję [Levine et al., 1999], u kobiet o stwierdzonej zwiększonej podatności na stres i rozwój depresji [Jung et al., 2010], a także w modelu depresji indukowanym długotrwałym stresem u szczurów [Guan et al., 2021]. Zatem unieczynnienie α_{1B} -AR lub α_{1D} -AR zwiększa stosunek Ca/Mg w TH, co potencjalnie może mieć

działanie prodepresyjne, a efekt ten nie jest obserwowany przy unieczynnieniu α_{1A} -AR.

PODSUMOWANIE: Modele *in vivo* poddano działaniu LPD z różnych grup i wykazano, że unieczynnienie α_1 -AR może modulować efekty działania tych leków w sposób złożony i zależny od podtypu oraz płci. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę podtypu α_{1D} w działaniu MIL u samców i w działaniu DMI u samic oraz sugerują, że efekt ten może wynikać z kompensacji funkcji podtypu α_{1D} przez podtyp α_{1A} .

5.5 Wnioski końcowe

Wyniki niniejszej rozprawy potwierdziły, że LPD działające antagonistycznie względem α_1 -AR wykazują najslabszy efekt na podtyp α_{1B} i uzupełniły tę wiedzę o kolejne związki - DMI i CIT. Dostarczyły również nowych danych w kontekście długotrwałego oddziaływania LPD na α_1 -AR wskazując, że prowadzi ono do wyraźnego nasilenia przekazu sygnału noradrenergicznego za pośrednictwem podtypu α_{1B} w wyniku działania IMI lub DMI oraz za pośrednictwem α_{1A} i α_{1B} w wyniku działania CIT, na skutek zwiększenia ich reaktywności na NA. Co ciekawe, w bezpośrednim działaniu na α_1 -AR leki te wykazywały najsilniejszy efekt antagonistyczny względem podtypu α_{1D} , co koreluje z wynikami uzyskanymi w modelach *in vivo*. Badania te wykazały bowiem na różnych poziomach molekularnych, że unieczynnienie podtypu α_{1D} u myszy moduluje efekty długotrwałego stosowania DMI lub MIL, w sposób zależny od płci. Ponadto sugerują, że może być to związane z kompensacją funkcji podtypu α_{1D} przez podtyp α_{1A} . Różnice międzypłciowe odnotowano również w poziomie pierwiastków w mózgu, jednak tutaj efekty działania badanych LPD nie były zależne od podtypów α_1 -AR.

Podsumowując, funkcjonalne zróżnicowanie podtypów α_1 -AR w efektach LPD wykazano zarówno w genetycznych modelach *in vitro*, jak i w modelach *in vivo*. Wyniki niniejszej rozprawy pozwoliły na bardziej precyzyjne zdefiniowanie funkcji wszystkich trzech podtypów α_1 -AR w efektach krótkotrwałego i długotrwałego stosowania klinicznie istotnych LPD oraz wyznaczyły liczne ścieżki, których zbadanie może przyczynić się do rozwoju nowych strategii farmakologicznych leczenia depresji.

Piśmiennictwo

- [Ahlquist, 1948] Ahlquist, R. P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 153(3):586–600.
- [Akinaga et al., 2019] Akinaga, J., García-Sáinz, J. A., and S. Pupo, A. (2019). Updates in the function and regulation of $\alpha 1$ -adrenoceptors. *British journal of pharmacology*, 176(14):2343–2357.
- [Akinaga et al., 2013] Akinaga, J., Lima, V., de Almeida Kiguti, L. R., Hebel-Barbosa, F., Alcántara-Hernández, R., García-Sáinz, J. A., and Pupo, A. S. (2013). Differential phosphorylation, desensitization, and internalization of $\alpha 1a$ -adrenoceptors activated by norepinephrine and oxymetazoline. *Molecular pharmacology*, 83(4):870–881.
- [Al Shirawi et al., 2017] Al Shirawi, M. I., Edgar, N. E., and Kennedy, S. H. (2017). Brexpiprazole in the treatment of major depressive disorder. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics*, 9:1179559X17731801.
- [Alcántara-Hernández et al., 2020] Alcántara-Hernández, R., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., and García-Sáinz, J. A. (2020). Glycogen synthase kinase-3 modulates $\alpha 1a$ -adrenergic receptor action and regulation. *European Journal of Cell Biology*, 99(2-3):151072.
- [Alcántara-Hernández et al., 2017] Alcántara-Hernández, R., Hernández-Méndez, A., Romero-Ávila, M. T., Alfonzo-Méndez, M. A., Pupo, A. S., and García-Sáinz, J. A. (2017). Noradrenaline, oxymetazoline and phorbol myristate acetate induce distinct functional actions and phosphorylation patterns of $\alpha 1a$ -adrenergic receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864(12):2378–2388.

- [Anderson, 2000] Anderson, I. M. (2000). Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *Journal of affective disorders*, 58(1):19–36.
- [Arboleda et al., 2010] Arboleda, G., Cárdenas, Y., Rodríguez, Y., Morales, L. C., Matheus, L., and Arboleda, H. (2010). Differential regulation of akt, mapk and gsk3 β during c2-ceramide-induced neuronal death. *Neurotoxicology*, 31(6):687–693.
- [Arundine and Tymianski, 2003] Arundine, M. and Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium*, 34(4-5):325–337.
- [Bangasser and Cuarenta, 2021] Bangasser, D. A. and Cuarenta, A. (2021). Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(11):674–684.
- [Berman et al., 2000] Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S., and Krystal, J. H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological psychiatry*, 47(4):351–354.
- [Berthelsen and Pettinger, 1977] Berthelsen, S. and Pettinger, W. A. (1977). A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. *Life sciences*, 21(5):595–606.
- [Beurel et al., 2011] Beurel, E., Song, L., and Jope, R. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice. *Molecular psychiatry*, 16(11):1068–1070.
- [Bobkova et al., 2015] Bobkova, N. V., Evgen'ev, M., Garbuz, D. G., Kulikov, A. M., Morozov, A., Samokhin, A., Velmeshev, D., Medvinskaya, N., Nesterova, I., Pollock, A., et al. (2015). Exogenous hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(52):16006–16011.
- [Bobkova et al., 2014] Bobkova, N. V., Garbuz, D. G., Nesterova, I., Medvinskaya, N., Samokhin, A., Alexandrova, I., Yashin, V., Karpov, V., Kukharsky, M. S.,

- Ninkina, N. N., et al. (2014). Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 38(2):425–435.
- [Böhmer et al., 2014] Böhmer, T., Pfeiffer, N., and Gericke, A. (2014). Three commercial antibodies against α 1-adrenergic receptor subtypes lack specificity in paraffin-embedded sections of murine tissues. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(7):703–706.
- [Breton-Provencher et al., 2021] Breton-Provencher, V., Drummond, G. T., and Sur, M. (2021). Locus coeruleus norepinephrine in learned behavior: anatomical modularity and spatiotemporal integration in targets. *Frontiers in Neural Circuits*, 15.
- [Castrén, 2014] Castrén, E. (2014). Neurotrophins and psychiatric disorders. *Neurotrophic Factors*, pages 461–479.
- [Castrén and Kojima, 2017] Castrén, E. and Kojima, M. (2017). Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiology of disease*, 97:119–126.
- [Chalothorn et al., 2002] Chalothorn, D., McCune, D. F., Edelmann, S. E., García-Cazarín, M. L., Tsujimoto, G., and Piascik, M. T. (2002). Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the α 1-adrenoceptor subtypes. *Molecular pharmacology*, 61(5):1008–1016.
- [Chapple et al., 1994] Chapple, C., Burt, R., Andersson, P., Greengrass, P., Wyllie, M., and Marshall, I. (1994). Alpha1-adrenoceptor subtypes in the human prostate. *British journal of urology*, 74(5):585–589.
- [Chen et al., 2021] Chen, S.-j., Gao, C.-c., Lv, Q.-y., Zhao, M.-q., Qin, X.-y., and Liao, H. (2021). Sortilin deletion in the prefrontal cortex and hippocampus ameliorates depressive-like behaviors in mice via regulating asm/ceramide signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, pages 1–15.
- [Chmielarz et al., 2015] Chmielarz, P., Kreiner, G., Kot, M., Zelek-Molik, A., Kowalska, M., Bagińska, M., Daniel, W. A., and Nalepa, I. (2015). Disruption

- of glucocorticoid receptors in the noradrenergic system leads to bdnf up-regulation and altered serotonergic transmission associated with a depressive-like phenotype in female grdbhcre mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 137:69–77.
- [Ciolek et al., 2011] Ciolek, J., Maïga, A., Marcon, E., Servent, D., and Gilles, N. (2011). Pharmacological characterization of zinc and copper interaction with the human $\alpha 1a$ -adrenoceptor. *European journal of pharmacology*, 655(1-3):1–8.
- [Citri and Malenka, 2008] Citri, A. and Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1):18–41.
- [Coccurello et al., 2014] Coccurello, R., Bielawski, A., Zelek-Molik, A., Vetulani, J., Kowalska, M., D’Amato, F. R., and Nalepa, I. (2014). Brief maternal separation affects brain $\alpha 1$ -adrenoceptors and apoptotic signaling in adult mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48:161–169.
- [Collaborators et al., 2022] Collaborators, G. . M. D. et al. (2022). Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *The Lancet Psychiatry*.
- [Collins and Klevay, 2011] Collins, J. F. and Klevay, L. M. (2011). Copper. *Adv Nutr*, 2(6):520–522.
- [Cotecchia et al., 2015] Cotecchia, S., Del Vescovo, C. D., Colella, M., Caso, S., and Diviani, D. (2015). The $\alpha 1$ -adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: signaling mechanisms and functional implications. *Cellular signalling*, 27(10):1984–1993.
- [Cotecchia et al., 1988] Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., and Kobilka, B. K. (1988). Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster $\alpha 1$ -adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(19):7159–7163.

- [Cowen et al., 1985] Cowen, P., Green, A., Grahame-Smith, D., and Braddock, L. (1985). Plasma melatonin during desmethylimipramine treatment: evidence for changes in noradrenergic transmission. *British journal of clinical pharmacology*, 19(6):799–805.
- [da Silva et al., 2021] da Silva, L. E. M., de Santana, M. L. P., Costa, P. R. d. F., Pereira, E. M., Nepomuceno, C. M. M., Queiroz, V. A. d. O., de Oliveira, L. P. M., Machado, M. E. P. d. C., and de Sena, E. P. (2021). Zinc supplementation combined with antidepressant drugs for treatment of patients with depression: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 79(1):1–12.
- [Daugaard et al., 2007] Daugaard, M., Rohde, M., and Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters*, 581(19):3702–3710.
- [Deutschenbaur et al., 2016] Deutschenbaur, L., Beck, J., Kiyhankhadiv, A., Mühlhauser, M., Borgwardt, S., Walter, M., Hasler, G., Sollberger, D., and Lang, U. E. (2016). Role of calcium, glutamate and nmda in major depression and therapeutic application. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64:325–333.
- [Dinoff et al., 2017] Dinoff, A., Herrmann, N., and Lanctôt, K. L. (2017). Ceramides and depression: A systematic review. *Journal of affective disorders*, 213:35–43.
- [Docherty, 2010] Docherty, J. R. (2010). Subtypes of functional $\alpha 1$ -adrenoceptor. *Cellular and molecular life sciences*, 67(3):405–417.
- [Doze et al., 2009] Doze, V. A., Handel, E. M., Jensen, K. A., Darsie, B., Luger, E. J., Haselton, J. R., Talbot, J. N., and Rorabaugh, B. R. (2009). $\alpha 1a$ - and $\alpha 1b$ -adrenergic receptors differentially modulate antidepressant-like behavior in the mouse. *Brain research*, 1285:148–157.
- [Doze et al., 2011] Doze, V. A., Papay, R. S., Goldenstein, B. L., Gupta, M. K., Collette, K. M., Nelson, B. W., Lyons, M. J., Davis, B. A., Luger, E. J., Wood, S. G., et al. (2011). Long-term $\alpha 1a$ -adrenergic receptor stimulation

- improves synaptic plasticity, cognitive function, mood, and longevity. *Molecular pharmacology*, 80(4):747–758.
- [Duda et al., 2020] Duda, P., Hajka, D., Wójcicka, O., Rakus, D., and Gizak, A. (2020). Gsk3 β : a master player in depressive disorder pathogenesis and treatment responsiveness. *Cells*, 9(3):727.
- [Duman and Li, 2012] Duman, R. S. and Li, N. (2012). A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of nmda receptor antagonists. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1601):2475–2484.
- [Duman and Monteggia, 2006] Duman, R. S. and Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry*, 59(12):1116–1127.
- [Duric and Duman, 2013] Duric, V. and Duman, R. S. (2013). Depression and treatment response: dynamic interplay of signaling pathways and altered neural processes. *Cellular and molecular life sciences*, 70(1):39–53.
- [Dziedzicka-Wasylewska et al., 2006] Dziedzicka-Wasylewska, M., Faron-Górecka, A., Kuśmider, M., Drozdowska, E., Rogóż, Z., Siwanowicz, J., Caron, M. G., and Bönisch, H. (2006). Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter. *Neuropsychopharmacology*, 31(11):2424–2432.
- [Eby and Eby, 2006] Eby, G. A. and Eby, K. L. (2006). Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Medical hypotheses*, 67(2):362–370.
- [Eby III and Eby, 2010] Eby III, G. A. and Eby, K. L. (2010). Magnesium for treatment-resistant depression: a review and hypothesis. *Medical hypotheses*, 74(4):649–660.
- [Elhwuegi, 2004] Elhwuegi, A. S. (2004). Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(3):435–451.

- [Faron-Górecka et al., 2004] Faron-Górecka, A., Kuśmider, M., Inan, S. Y., Siwanowicz, J., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2004). Effects of tramadol on $\alpha 2$ -adrenergic receptors in the rat brain. *Brain research*, 1016(2):263–267.
- [Faure et al., 1994] Faure, C., Pimoule, C., Vallancien, G., Langer, S., and Graham, D. (1994). Identification of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes present in the human prostate. *Life sciences*, 54(21):1595–1605.
- [Feldman et al., 1997] Feldman, R. S., Meyer, J. S., and Quenzer, L. F. (1997). *Principles of neuropsychopharmacology*. Sinauer Associates.
- [Ferrerri et al., 2001] Ferreri, M., Lavergne, F., Berlin, I., Payan, C., and Puech, A. (2001). Benefits from mianserin augmentation of fluoxetine in patients with major depression non-responders to fluoxetine alone. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 103(1):66–72.
- [Filip et al., 1989] Filip, V., Alda, M., David, I., Topinka, J., Křištofiková, Z., Dvořáková, J., Sztaniszláv, D., Olajos, S., and Albrecht, V. (1989). Neuroendocrine response to clomipramine and desipramine—the evidence of partial determination by heredity and sex. *Neuropsychobiology*, 21(3):111–116.
- [Gałęcki and Bliźniewska-Kowalska, 2021] Gałęcki, P. and Bliźniewska-Kowalska, K. (2021). Depresja oporna na leczenie—zalecenia konsultanta krajowego w dziedzinie psychiatrii. *Psychiatria Polska*, 55(1):7–21.
- [Galeotti et al., 2006] Galeotti, N., Bartolini, A., and Ghelardini, C. (2006). Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Neuropharmacology*, 50(3):309–316.
- [García-Sáinz et al., 2010] García-Sáinz, J. A., Romero-Ávila, M. T., and del Carmen Medina, L. (2010). $\alpha 1d$ -adrenergic receptors: Constitutive activity and reduced expression at the plasma membrane. In *Methods in enzymology*, volume 484, pages 109–125. Elsevier.
- [García-Sáinz et al., 2000] García-Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J., and del Carmen Medina, L. (2000). $\alpha 1$ -adrenoceptors: function and phosphorylation. *European journal of pharmacology*, 389(1):1–12.

- [Gentleman et al., 2004] Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology*, 5(10):1–16.
- [Gillman, 2007] Gillman, P. (2007). Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *British journal of pharmacology*, 151(6):737–748.
- [Gray and Hughes, 2015] Gray, V. C. and Hughes, R. N. (2015). Drug-, dose- and sex-dependent effects of chronic fluoxetine, reboxetine and venlafaxine on open-field behavior and spatial memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 281:43–54.
- [Grimes and Jope, 2001a] Grimes, C. A. and Jope, R. S. (2001a). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 β and facilitated by lithium. *Journal of neurochemistry*, 78(6):1219–1232.
- [Grimes and Jope, 2001b] Grimes, C. A. and Jope, R. S. (2001b). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Progress in neurobiology*, 65(4):391–426.
- [Guan et al., 2021] Guan, T., Cao, C., Hou, Y., Li, Y., Wei, X., Li, S., Jia, S., and Zhao, X. (2021). Effects of quercetin on the alterations of serum elements in chronic unpredictable mild stress-induced depressed rats. *Biometals*, 34(3):589–602.
- [Gulbins et al., 2013] Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Lüth, A., Böhmer, C., Amato, D., Müller, C. P., Tischbirek, C. H., Groemer, T. W., Tabatabai, G., et al. (2013). Acid sphingomyelinase–ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nature medicine*, 19(7):934–938.
- [Gulbins et al., 2015] Gulbins, E., Walter, S., Becker, K. A., Halmer, R., Liu, Y., Reichel, M., Edwards, M. J., Müller, C. P., Fassbender, K., and Kornhuber, J. (2015). A central role for the acid sphingomyelinase/ceramide system in neurogenesis and major depression. *Journal of neurochemistry*, 134(2):183–192.

- [Haduch et al., 2016] Haduch, A., Bromek, E., Wójcikowski, J., Gołębiewska, K., and Daniel, W. A. (2016). Melatonin supports cyp2d-mediated serotonin synthesis in the brain. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(3):445–452.
- [Haduch et al., 2022] Haduch, A., Danek, P. J., Kuban, W., Pukło, R., Alenina, N., Gołębiewska, J., Popik, P., Bader, M., and Daniel, W. A. (2022). Cytochrome p450 2d (cyp2d) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female dark agouti rats. *Neurochemistry international*, 152:105223.
- [Hague et al., 2004a] Hague, C., Chen, Z., Pupo, A. S., Schulte, N. A., Toews, M. L., and Minneman, K. P. (2004a). The n terminus of the human α 1d-adrenergic receptor prevents cell surface expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(1):388–397.
- [Hague et al., 2004b] Hague, C., Uberti, M. A., Chen, Z., Hall, R. A., and Minneman, K. P. (2004b). Cell surface expression of α 1d-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with α 1b-adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15):15541–15549.
- [Hajós et al., 2004] Hajós, M., Fleishaker, J. C., Filipiak-Reisner, J. K., Brown, M. T., and Wong, E. H. (2004). The selective norepinephrine reuptake inhibitor antidepressant reboxetine: pharmacological and clinical profile. *CNS drug reviews*, 10(1):23–44.
- [Harding et al., 2018] Harding, S. D., Sharman, J. L., Faccenda, E., Southan, C., Pawson, A. J., Ireland, S., Gray, A. J., Bruce, L., Alexander, S. P., Anderton, S., et al. (2018). The iuphar/bps guide to pharmacology in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to immunopharmacology. *Nucleic acids research*, 46(D1):D1091–D1106.
- [Harmer et al., 2017] Harmer, C. J., Duman, R. S., and Cowen, P. J. (2017). How do antidepressants work? new perspectives for refining future treatment approaches. *The Lancet Psychiatry*, 4(5):409–418.

- [Hein and Michel, 2007] Hein, P. and Michel, M. C. (2007). Signal transduction and regulation: Are all α 1-adrenergic receptor subtypes created equal? *Biochemical pharmacology*, 73(8):1097–1106.
- [Hieble, 1995] Hieble, J. P. (1995). International union of pharmacology. x. recommendation for nomenclature of α 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.*, 47:267–270.
- [Hillhouse and Porter, 2015] Hillhouse, T. M. and Porter, J. H. (2015). A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 23(1):1.
- [Hirasawa et al., 1997] Hirasawa, A., Sugawara, T., Awaji, T., Tsumaya, K., Ito, H., and Tsujimoto, G. (1997). Subtype-specific differences in subcellular localization of α 1-adrenoceptors: chloroethylclonidine preferentially alkylates the accessible cell surface α 1-adrenoceptors irrespective of the subtype. *Molecular pharmacology*, 52(5):764–770.
- [Inkster et al., 2018] Inkster, B., Zai, G., Lewis, G., and Miskowiak, K. W. (2018). Gsk3 β : a plausible mechanism of cognitive and hippocampal changes induced by erythropoietin treatment in mood disorders? *Translational psychiatry*, 8(1):1–13.
- [Izzo Jr et al., 1994] Izzo Jr, N. J., Tulenko, T. N., and Colucci, W. S. (1994). Phorbol esters and norepinephrine destabilize alpha 1b-adrenergic receptor mRNA in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3):1705–1710.
- [Jana et al., 2009] Jana, A., Hogan, E. L., and Pahan, K. (2009). Ceramide and neurodegeneration: susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *Journal of the neurological sciences*, 278(1-2):5–15.
- [Jarończyk and Walory, 2022] Jarończyk, M. and Walory, J. (2022). Novel molecular targets of antidepressants. *Molecules*, 27(2):533.
- [Jazvinščak Jembrek et al., 2015] Jazvinščak Jembrek, M., Hof, P. R., and Šimić, G. (2015). Ceramides in alzheimer’s disease: key mediators of neuronal

apoptosis induced by oxidative stress and $\alpha\beta$ accumulation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.

[Jensen et al., 2009] Jensen, B. C., Swigart, P. M., and Simpson, P. C. (2009). Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 379(4):409.

[Jung et al., 2010] Jung, K. I., Ock, S. M., Chung, J. H., and Song, C. H. (2010). Associations of serum ca and mg levels with mental health in adult women without psychiatric disorders. *Biological trace element research*, 133(2):153–161.

[Kenny et al., 1996] Kenny, B., Miller, A., Williamson, I., O'Connell, J., Chalmers, D., and Naylor, A. (1996). Evaluation of the pharmacological selectivity profile of $\alpha 1$ adrenoceptor antagonists at prostatic $\alpha 1$ adrenoceptors: binding, functional and in vivo studies. *British journal of pharmacology*, 118(4):871–878.

[Klimek et al., 1991] Klimek, V., Zak-Knapik, J., and Maj, J. (1991). Antidepressants given repeatedly increase the alpha 1-adrenoceptor agonist affinity in the rat brain. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 43(5):347–352.

[Kokras et al., 2019] Kokras, N., Hodes, G. E., Bangasser, D. A., and Dalla, C. (2019). Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: an obstacle to antidepressant drug development? *British journal of pharmacology*, 176(21):4090–4106.

[Konstandi et al., 2000] Konstandi, M., Johnson, E., Lang, M. A., Malamas, M., and Marselos, M. (2000). Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on brain biogenic amines in mice and rats. *Pharmacological Research*, 41(3):341–346.

[Kornhauser et al., 2002] Kornhauser, J. M., Cowan, C. W., Shaywitz, A. J., Dolmetsch, R. E., Griffith, E. C., Hu, L. S., Haddad, C., Xia, Z., and Greenberg, M. E. (2002). Creb transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron*, 34(2):221–233.

- [Kornhuber et al., 2014] Kornhuber, J., Müller, C. P., Becker, K. A., Reichel, M., and Gulbins, E. (2014). The ceramide system as a novel antidepressant target. *Trends in pharmacological sciences*, 35(6):293–304.
- [Kornhuber et al., 2009] Kornhuber, J., Reichel, M., Tripal, P., Groemer, T. W., Henkel, A. W., Mühle, C., and Gulbins, E. (2009). The role of ceramide in major depressive disorder. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 259(2):199–204.
- [Koshimizu et al., 2007] Koshimizu, T.-a., Tanoue, A., and Tsujimoto, G. (2007). Clinical implications from studies of $\alpha 1$ adrenergic receptor knockout mice. *Biochemical pharmacology*, 73(8):1107–1112.
- [Kountz et al., 2016] Kountz, T. S., Lee, K.-S., Aggarwal-Howarth, S., Curran, E., Park, J.-M., Harris, D.-A., Stewart, A., Hendrickson, J., Camp, N. D., Wolf-Yadlin, A., et al. (2016). Endogenous n-terminal domain cleavage modulates $\alpha 1$ -adrenergic receptor pharmacodynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 291(35):18210–18221.
- [Kreiner et al., 2013] Kreiner, G., Bierhoff, H., Armentano, M., Rodriguez-Parkitna, J., Sowodniok, K., Naranjo, J. R., Bonfanti, L., Liss, B., Schuetz, G., Grummt, I., et al. (2013). A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death & Differentiation*, 20(11):1455–1464.
- [Kreiner et al., 2011] Kreiner, G., Zelek-Molik, A., Kowalska, M., Bielawski, A., Antkiewicz-Michaluk, L., and Nalepa, I. (2011). Effects of the noradrenergic neurotoxin dsp-4 on the expression of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes after antidepressant treatment. *Pharmacological Reports*, 63(6):1349–1358.
- [Krishnan and Nestler, 2008] Krishnan, V. and Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215):894–902.
- [Kusmider et al., 2020] Kusmider, M., Faron-Górecka, A., Solich, J., Pabian, P., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2020). Time-course of changes in key catecholaminergic receptors and trophic systems in rat brain after antidepressant administration. *Neurochemistry International*, 141:104885.

- [Lanni et al., 2009] Lanni, C., Govoni, S., Lucchelli, A., and Boselli, C. (2009). Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. *Cellular and molecular life sciences*, 66(18):2985–3008.
- [Ledesma-Corvi and García-Fuster, 2022] Ledesma-Corvi, S. and García-Fuster, M. J. (2022). Revisiting the antidepressant-like effects of desipramine in male and female adult rats: sex disparities in neurochemical correlates. *Pharmacological Reports*, pages 1–11.
- [LeGates et al., 2019] LeGates, T. A., Kvarta, M. D., and Thompson, S. M. (2019). Sex differences in antidepressant efficacy. *Neuropsychopharmacology*, 44(1):140–154.
- [Lei et al., 2002] Lei, B., Zhang, Y., and Han, C. (2002). Changes in mrna expression induced by sustained noradrenaline stimulation are different for $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in hek293 cells. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 29(12):1084–1090.
- [Lennarz and Lane, 2013] Lennarz, W. J. and Lane, M. D. (2013). *Encyclopedia of biological chemistry*. Academic Press.
- [Lepack et al., 2015] Lepack, A. E., Fuchikami, M., Dwyer, J. M., Banasr, M., and Duman, R. S. (2015). Bdnf release is required for the behavioral actions of ketamine. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(1):pyu033.
- [Levine et al., 1999] Levine, J., Stein, D., Rapoport, A., and Kurtzman, L. (1999). High serum and cerebrospinal fluid ca/mg ratio in recently hospitalized acutely depressed patients. *Neuropsychobiology*, 39(2):63–70.
- [Liu et al., 2020] Liu, X., Zhong, S., Li, Z., Chen, J., Wang, Y., Lai, S., Miao, H., and Jia, Y. (2020). Serum copper and zinc levels correlate with biochemical metabolite ratios in the prefrontal cortex and lentiform nucleus of patients with major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 99:109828.
- [Lomasney et al., 1991] Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W. Y., Schwinn, D. A., Yang-Feng, T. L., Brownstein, M., Lefkowitz, R. J., and Caron,

- M. G. (1991). Molecular cloning and expression of the cdna for the alpha 1a-adrenergic receptor. the gene for which is located on human chromosome 5. *Journal of Biological Chemistry*, 266(10):6365–6369.
- [Łoza et al., 2007] Łoza, B., Czernikiewicz, A., Patejuk-Mazurek, I., Roszkowska, A., Britmann, J., Grzesiewska, J., and Mosiołek, A. (2007). Politerapia zaburzeń depresyjnych. preferencje polskich psychiatrów. *Psychiatria*, 4(3):97–104.
- [Ma et al., 2017] Ma, M., Ren, Q., Yang, C., Zhang, J.-c., Yao, W., Dong, C., Ohgi, Y., Futamura, T., and Hashimoto, K. (2017). Antidepressant effects of combination of brexpiprazole and fluoxetine on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Psychopharmacology*, 234(4):525–533.
- [Machado and Einarson, 2010] Machado, M. and Einarson, T. (2010). Comparison of ssris and snris in major depressive disorder: a meta-analysis of head-to-head randomized clinical trials. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 35(2):177–188.
- [Maj, 2000] Maj, J. (2000). Farmakologia leków przeciwdepresyjnych. In Bijak, M. and Lasoń, W., editors, *Neuropsychofarmakologia. Dziś i jutro*. Instytut Farmakologii PAN w Krakowie.
- [Maj et al., 1984] Maj, J., Przegalinski, E., and Mogilnicka, E. (1984). Hypotheses concerning the mechanism of action of antidepressant drugs. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 100*, pages 1–74.
- [Maj et al., 2000] Maj, J., Rogóż, Z., Dlaboga, D., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2000). Pharmacological effects of milnacipran, a new antidepressant, given repeatedly on the α 1-adrenergic and serotonergic 5-HT_{2A} systems. *Journal of neural transmission*, 107(11):1345–1359.
- [Małczyńska et al., 2019] Małczyńska, P., Piotrowicz, Z., Drabarek, D., Langfort, J., and Chalimoniuk, M. (2019). Rola mózgowego czynnika neurotroficznego (bdnf) w procesach neurodegeneracji oraz w mechanizmach neuroregeneracji wywołanej wzmożoną aktywnością fizyczną. *Postępy Biochemii*, 65(1):2–8.

- [Maletic et al., 2017] Maletic, V., Eramo, A., Gwin, K., Offord, S. J., and Duffy, R. A. (2017). The role of norepinephrine and its α -adrenergic receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder and schizophrenia: a systematic review. *Frontiers in psychiatry*, 8:42.
- [Mao et al., 2004] Mao, L., Tang, Q., Samdani, S., Liu, Z., and Wang, J. Q. (2004). Regulation of mapk/erk phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 19(5):1207–1216.
- [Marsden, 2013] Marsden, W. (2013). Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 43:168–184.
- [Mayer et al., 1984] Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg^{2+} of nmda responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965):261–263.
- [McCune et al., 2000] McCune, D. F., Edelmann, S. E., Olges, J. R., Post, G. R., Waldrop, B. A., Waugh, D. J., Perez, D. M., and Piascik, M. T. (2000). Regulation of the cellular localization and signaling properties of the $\alpha 1\text{b}$ - and $\alpha 1\text{d}$ -adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Molecular pharmacology*, 57(4):659–666.
- [McEwen et al., 2015] McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., and Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature neuroscience*, 18(10):1353–1363.
- [McEwen and Morrison, 2013] McEwen, B. S. and Morrison, J. H. (2013). The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron*, 79(1):16–29.
- [McGrath, 2015] McGrath, J. C. (2015). Localization of α -adrenoceptors: Jr v ane m edal l ecture. *British journal of pharmacology*, 172(5):1179–1194.
- [Mei et al., 2021] Mei, X., Wang, L., Yang, B., and Li, X. (2021). Sex differences in noradrenergic modulation of attention and impulsivity in rats. *Psychopharmacology*, 238(8):2167–2177.

- [Menkes et al., 1983] Menkes, D. B., Aghajanian, G. K., and Gallager, D. W. (1983). Chronic antidepressant treatment enhances agonist affinity of brain α 1-adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*, 87(1):35–41.
- [Mi et al., 2012] Mi, H., Muruganujan, A., and Thomas, P. D. (2012). Panther in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic acids research*, 41(D1):D377–D386.
- [Michelotti et al., 2000] Michelotti, G. A., Price, D. T., and Schwinn, D. A. (2000). α 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacology & therapeutics*, 88(3):281–309.
- [Mishima et al., 2004] Mishima, K., Tanoue, A., Tsuda, M., Hasebe, N., Fukue, Y., Egashira, N., Takano, Y., Kamiya, H.-o., Tsujimoto, G., Iwasaki, K., et al. (2004). Characteristics of behavioral abnormalities in α 1d-adrenoceptors deficient mice. *Behavioural brain research*, 152(2):365–373.
- [Młyniec et al., 2013] Młyniec, K., Budziszewska, B., Reczyński, W., Doboszevska, U., Pilc, A., and Nowak, G. (2013). Zinc deficiency alters responsiveness to antidepressant drugs in mice. *Pharmacological Reports*, 65(3):579–592.
- [Młyniec and Nowak, 2012] Młyniec, K. and Nowak, G. (2012). Zinc deficiency induces behavioral alterations in the tail suspension test in mice. effect of antidepressants. *Pharmacological Reports*, 64(2):249–255.
- [Morishita and Arita, 2003] Morishita, S. and Arita, S. (2003). Differential effects of milnacipran, fluvoxamine and paroxetine for depression, especially in gender. *European psychiatry*, 18(8):418–420.
- [Morrow and Creese, 1986] Morrow, A. L. and Creese, I. (1986). Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3h]wb4104 and [3h] prazosin binding. *Molecular pharmacology*, 29(4):321–330.
- [Moylan et al., 2014] Moylan, S., Berk, M., Dean, O. M., Samuni, Y., Williams, L. J., O’Neil, A., Hayley, A. C., Pasco, J. A., Anderson, G., Jacka, F. N., et al. (2014). Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 45:46–62.

- [Naito et al., 2007] Naito, S., Sato, K., Yoshida, K., Higuchi, H., Takahashi, H., Kamata, M., Ito, K., Ohkubo, T., and Shimizu, T. (2007). Gender differences in the clinical effects of fluvoxamine and milnacipran in japanese major depressive patients. *Psychiatry and clinical neurosciences*, 61(4):421–427.
- [Nalepa et al., 2013] Nalepa, I., Kreiner, G., Bielawski, A., Rafa-Zabłocka, K., and Roman, A. (2013). α 1-adrenergic receptor subtypes in the central nervous system: insights from genetically engineered mouse models. *Pharmacological Reports*, 65(6):1489–1497.
- [Nalepa et al., 2002] Nalepa, I., Kreiner, G., Kowalska, M., Sanak, M., Zelek-Molik, A., and Vetulani, J. (2002). Repeated imipramine and electroconvulsive shock increase α 1a-adrenoceptor mrna level in rat prefrontal cortex. *European journal of pharmacology*, 444(3):151–159.
- [Nalepa and Sulser, 2004] Nalepa, I. and Sulser, F. (2004). New hypotheses to guide future antidepressant drug development. In Preskorn, S. H., Stanga, C. Y., Feighner, J. P., and Ross, R., editors, *Antidepressants: past, present and future*, pages 519–563. Springer.
- [Nalepa and Vetulani, 1991] Nalepa, I. and Vetulani, J. (1991). Involvement of protein kinase c in the mechanism of in vitro effects of imipramine on generation of second messengers by noradrenaline in cerebral cortical slices of the rat. *Neuroscience*, 44(3):585–590.
- [Nalepa and Vetulani, 1993] Nalepa, I. and Vetulani, J. (1993). Enhancement of the responsiveness of cortical adrenergic receptors by chronic administration of the 5-hydroxytryptamine uptake inhibitor citalopram. *Journal of neurochemistry*, 60(6):2029–2035.
- [Nalepa and Vetulani, 1994] Nalepa, I. and Vetulani, J. (1994). The responsiveness of cerebral cortical adrenergic receptors after chronic administration of atypical antidepressant mianserin. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 19(2):120.
- [Nalepa and Vetulani, 2004] Nalepa, I. and Vetulani, J. (2004). Receptory adrenergiczne. In Nowak, J. Z. and Zawilska, J. B., editors, *Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału*. Wydawnictwo Naukowe PWN.

- [Nalepa et al., 2005] Nalepa, I., Vetulani, J., Borghi, V., Kowalska, M., Przewłocka, B., and Pavone, F. (2005). Formalin hindpaw injection induces changes in the [3h] prazosin binding to $\alpha 1$ -adrenoceptors in specific regions of the mouse brain and spinal cord. *Journal of neural transmission*, 112(10):1309–1319.
- [Ni et al., 2018] Ni, M., You, Y., Chen, J., and Zhang, L. (2018). Copper in depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Psychiatry research*, 267:506–515.
- [Nibuya et al., 1996] Nibuya, M., Nestler, E. J., and Duman, R. S. (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of camp response element binding protein (creb) in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 16(7):2365–2372.
- [Nojimoto et al., 2010] Nojimoto, F., Mueller, A., Hebel-Barbosa, F., Akinaga, J., Lima, V., Kiguti, L. d. A., and Pupo, A. (2010). The tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline and imipramine are weak antagonists of human and rat $\alpha 1b$ -adrenoceptors. *Neuropharmacology*, 59(1-2):49–57.
- [Nowak et al., 2010] Nowak, G., Dybała, M., Siwek, A., and Szewczyk, B. (2010). Współczesna farmakoterapia depresji. mechanizmy działania terapeutycznego i przedkliniczne metody badania leków przeciwdepresyjnych. In Adamek, D. and Nowak, G., editors, *Wokół depresji. Problemy farmakoterapii depresji i współistniejących schorzeń*. ZOZ Ośrodek UMEA Shinoda-Kuracejo.
- [Nowak and Przegaliński, 1988] Nowak, G. and Przegaliński, E. (1988). Effect of repeated treatment with antidepressant drugs and electroconvulsive shock (ecs) on [3h] prazosin binding to different rat brain structures. *Journal of neural transmission*, 71(1):57–64.
- [Nowak et al., 2005] Nowak, G., Szewczyk, B., and Pilc, A. (2005). Zinc and depression. an update. *Pharmacol Rep*, 57(6):713–8.
- [Nowak et al., 1984] Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950):462–465.

- [Okamoto et al., 2010] Okamoto, H., Voleti, B., Banasr, M., Sarhan, M., Duric, V., Girgenti, M. J., DiLeone, R. J., Newton, S. S., and Duman, R. S. (2010). Wnt2 expression and signaling is increased by different classes of antidepressant treatments. *Biological psychiatry*, 68(6):521–527.
- [Omata et al., 2011] Omata, N., Chiu, C.-T., Moya, P. R., Leng, Y., Wang, Z., Hunsberger, J. G., Leeds, P., and Chuang, D.-M. (2011). Lentivirally mediated gsk-3 β silencing in the hippocampal dentate gyrus induces antidepressant-like effects in stressed mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(5):711–717.
- [Opazo et al., 2014] Opazo, C. M., Greenough, M. A., and Bush, A. I. (2014). Copper: from neurotransmission to neuroproteostasis. *Frontiers in aging neuroscience*, 6:143.
- [Organization et al., 2019] Organization, W. H. et al. (2019). Integrating the prevention, treatment and care of mental health conditions and other noncommunicable diseases within health systems: Who european high-level conference on noncommunicable diseases: time to deliver—meeting ncd targets to achieve sustainable development goals in europe: 9–10 april 2019, ashgabat, turkmenistan. Technical report, World Health Organization. Regional Office for Europe.
- [Papay et al., 2006] Papay, R., Gaivin, R., Jha, A., McCune, D. F., McGrath, J. C., Rodrigo, M. C., Simpson, P. C., Doze, V. A., and Perez, D. M. (2006). Localization of the mouse α 1a-adrenergic receptor (ar) in the brain: α 1aar is expressed in neurons, gabaergic interneurons, and ng2 oligodendrocyte progenitors. *Journal of Comparative Neurology*, 497(2):209–222.
- [Papay et al., 2004] Papay, R., Gaivin, R., McCune, D. F., Rorabaugh, B. R., Macklin, W. B., McGrath, J. C., and Perez, D. M. (2004). Mouse α 1b-adrenergic receptor is expressed in neurons and ng2 oligodendrocytes. *Journal of Comparative Neurology*, 478(1):1–10.
- [Pardo et al., 2016] Pardo, M., Abrial, E., Jope, R. S., and Beurel, E. (2016). Gsk3 β isoform-selective regulation of depression, memory and hippocampal cell proliferation. *Genes, brain and behavior*, 15(3):348–355.

- [Pavlidis et al., 2021] Pavlidis, P., Kokras, N., and Dalla, C. (2021). Antidepressants' effects on testosterone and estrogens: What do we know? *European journal of pharmacology*, 899:173998.
- [Pavlidis et al., 2022] Pavlidis, P., Kokras, N., and Dalla, C. (2022). Sex differences in depression and anxiety. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer.
- [Paxinos and Franklin, 2001] Paxinos, G. and Franklin, K. B. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press.
- [Pereira and Hiroaki-Sato, 2018] Pereira, V. S. and Hiroaki-Sato, V. A. (2018). A brief history of antidepressant drug development: from tricyclics to beyond ketamine. *Acta neuropsychiatrica*, 30(6):307–322.
- [Perez, 2020] Perez, D. M. (2020). α 1-adrenergic receptors in neurotransmission, synaptic plasticity, and cognition. *Frontiers in pharmacology*, 11.
- [Perez, 2021] Perez, D. M. (2021). Current developments on the role of α 1-adrenergic receptors in cognition, cardioprotection, and metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
- [Perez et al., 1991] Perez, D. M., Piascik, M. T., and Graham, R. M. (1991). Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1d-adrenergic receptor cDNA. *Molecular Pharmacology*, 40(6):876–883.
- [Pilc et al., 2000] Pilc, A., Bijak, M., and Nowak, G. (2000). Perspektywy badań nad lekami przeciwdepresyjnymi. In Bijak, M. and Lasoń, W., editors, *Neuropsychofarmakologia. Dziś i jutro*. Instytut Farmakologii PAN w Krakowie.
- [Pittenger and Duman, 2008] Pittenger, C. and Duman, R. S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1):88–109.
- [Poleszak et al., 2004] Poleszak, E., Szewczyk, B., Kędzierska, E., Wlaź, P., Pilc, A., and Nowak, G. (2004). Antidepressant and anxiolytic-like activity of magnesium in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(1):7–12.

- [Poleszak et al., 2008] Poleszak, E., Szewczyk, B., Wlaz, A., Fidecka, S., Wlaz, P., Pilc, A., and Nowak, G. (2008). D-serine, a selective glycine/n-methyl-d-aspartate receptor agonist, antagonizes the antidepressant-like effects of magnesium and zinc in mice. *Pharmacological Reports*, 60(6):996.
- [Poleszak et al., 2005] Poleszak, E., Wlaź, P., Szewczyk, B., Kędzierska, E., Wyska, E., Librowski, T., Szymura-Oleksiak, J., Fidecka, S., Pilc, A., and Nowak, G. (2005). Enhancement of antidepressant-like activity by joint administration of imipramine and magnesium in the forced swim test: behavioral and pharmacokinetic studies in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(3):524–529.
- [Popoli et al., 2012] Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., and Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(1):22–37.
- [Porto et al., 2018] Porto, R. R., Dutra, F. D., Crestani, A. P., Holsinger, R. D., Quillfeldt, J. A., de Bittencourt Jr, P. I. H., and de Oliveira Alvares, L. (2018). Hsp70 facilitates memory consolidation of fear conditioning through mapk pathway in the hippocampus. *Neuroscience*, 375:108–118.
- [Prohaska and Smith, 1982] Prohaska, J. R. and Smith, T. L. (1982). Effect of dietary or genetic copper deficiency on brain catecholamines, trace metals and enzymes in mice and rats. *The Journal of Nutrition*, 112(9):1706–1717.
- [Proudman et al., 2020] Proudman, R. G., Pupo, A. S., and Baker, J. G. (2020). The affinity and selectivity of α -adrenoceptor antagonists, antidepressants, and antipsychotics for the human $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, and $\alpha 1d$ -adrenoceptors. *Pharmacology research & perspectives*, 8(4):e00602.
- [Puozzo et al., 2002] Puozzo, C., Panconi, E., and Deprez, D. (2002). Pharmacology and pharmacokinetics of milnacipran. *International clinical psychopharmacology*, 17:S25–35.
- [Purves et al., 2004] Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, Anthony-Samuel nad McNamara, J. O., and S, W. M. (2004). *Neuroscience 3rd edition*. Sinauer Associates.

- [Rajagopal and Shenoy, 2018] Rajagopal, S. and Shenoy, S. K. (2018). GPCR desensitization: acute and prolonged phases. *Cellular signalling*, 41:9–16.
- [Rogoz and Kolasiewicz, 2001] Rogoz, Z. and Kolasiewicz, W. (2001). Effect of repeated treatment with reboxetine on the central α_1 -adrenergic system. *Polish journal of pharmacology*, 53(6):663–668.
- [Ruhé et al., 2007] Ruhé, H. G., Mason, N. S., and Schene, A. H. (2007). Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Molecular psychiatry*, 12(4):331–359.
- [Russo, 2010] Russo, A. (2010). Increased serum Cu/Zn SOD in individuals with clinical depression normalizes after zinc and anti-oxidant therapy. *Nutrition and Metabolic Insights*, 3:NMI–S5044.
- [Russo, 2011] Russo, A. (2011). Decreased zinc and increased copper in individuals with anxiety. *Nutrition and metabolic insights*, 4:NMI–S6349.
- [Sadalge et al., 2003] Sadalge, A., Coughlin, L., Fu, H., Wang, B., Valladares, O., Valentino, R., and Blendy, J. (2003). α_1 adrenoceptor signaling is required for stimulus induced locomotor activity. *Molecular psychiatry*, 8(7):664–672.
- [Sanbe et al., 2007] Sanbe, A., Tanaka, Y., Fujiwara, Y., Tsumura, H., Yamauchi, J., Cotecchia, S., Koike, K., Tsujimoto, G., and Tanoue, A. (2007). α_1 -adrenoceptors are required for normal male sexual function. *British journal of pharmacology*, 152(3):332–340.
- [Santomauro et al., 2021] Santomauro, D. F., Herrera, A. M. M., Shadid, J., Zheng, P., Ashbaugh, C., Pigott, D. M., Abbafati, C., Adolph, C., Amlag, J. O., Aravkin, A. Y., et al. (2021). Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet*, 398(10312):1700–1712.
- [Schildkraut, 1965] Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American journal of Psychiatry*, 122(5):509–522.

- [Schlegel-Zawadzka and Nowak, 2000] Schlegel-Zawadzka, M. and Nowak, G. (2000). Alterations in serum and brain trace element levels after antidepressant treatment. part ii. copper. *Biological Trace Element Research*, 73(1):37–45.
- [Schumacher et al., 2022] Schumacher, F., Edwards, M. J., Mühle, C., Carpinteiro, A., Wilson, G. C., Wilker, B., Soddemann, M., Keitsch, S., Scherbaum, N., Müller, B. W., et al. (2022). Ceramide levels in blood plasma correlate with major depressive disorder severity and its neutralization abrogates depressive behavior in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 298(8).
- [Schwinn et al., 1990] Schwinn, D. A., Lomasney, J. W., Lorenz, W., Szklut, P. J., Freneau Jr, R., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Cotecchia, S. (1990). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry*, 265(14):8183–8189.
- [Senese et al., 2018] Senese, N. B., Rasenick, M. M., and Traynor, J. R. (2018). The role of G-proteins and G-protein regulating proteins in depressive disorders. *Frontiers in Pharmacology*, page 1289.
- [Sensi et al., 2009] Sensi, S. L., Paoletti, P., and Bush, Ashley I nad Sekler, I. (2009). Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci*, 10:780–791.
- [Shah and Frazer, 2014] Shah, A. and Frazer, A. (2014). Influence of acute or chronic administration of ovarian hormones on the effects of desipramine in the forced swim test in female rats. *Psychopharmacology*, 231(18):3685–3694.
- [Sharman et al., 2018] Sharman, J. L., Harding, S. D., Southan, C., Faccenda, E., Pawson, A. J., Davies, J. A., and NC-IUPHAR (2018). Accessing expert-curated pharmacological data in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. *Current protocols in bioinformatics*, 61(1):1–34.
- [Shevtsov et al., 2014a] Shevtsov, M. A., Nikolaev, B. P., Yakovleva, L. Y., Dobrodumov, A. V., Dayneko, A. S., Shmonin, A. A., Vlasov, T. D., Melnikova, E. V., Vilisov, A. D., Guzhova, I. V., et al. (2014a). Neurotherapeutic activity of

- the recombinant heat shock protein hsp70 in a model of focal cerebral ischemia in rats. *Drug design, development and therapy*, 8:639.
- [Shevtsov et al., 2014b] Shevtsov, M. A., Pozdnyakov, A. V., Mikhrina, A. L., Yakovleva, L. Y., Nikolaev, B. P., Dobrodumov, A. V., Komarova, E. Y., Meshalkina, D. A., Ischenko, A. M., Pitkin, E., et al. (2014b). Effective immunotherapy of rat glioblastoma with prolonged intratumoral delivery of exogenous heat shock protein hsp70. *International Journal of Cancer*, 135(9):2118–2128.
- [Silva et al., 2008] Silva, R., Mesquita, A., Bessa, J., Sousa, J. C., Sotiropoulos, I., Leão, P., Almeida, O. F., and Sousa, N. (2008). Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3 β . *Neuroscience*, 152(3):656–669.
- [Simpson et al., 2012] Simpson, J., Ryan, C., Curley, A., Mulcaire, J., and Kelly, J. P. (2012). Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 37(2):227–236.
- [Siwek et al., 2009] Siwek, M., Dudek, D., Paul, I. A., Sowa-Kućma, M., Zięba, A., Popik, P., Pilc, A., and Nowak, G. (2009). Zinc supplementation augments efficacy of imipramine in treatment resistant patients: a double blind, placebo-controlled study. *Journal of affective disorders*, 118(1-3):187–195.
- [Siwek et al., 2013] Siwek, M., Szewczyk, B., Dudek, D., Styczeń, K., Sowa-Kućma, M., Młyniec, K., Siwek, A., Witkowski, L., Pochwat, B., and Nowak, G. (2013). Zinc as a marker of affective disorders. *Pharmacological reports*, 65(6):1512–1518.
- [Siwek et al., 2005] Siwek, M., Wróbel, A., Dudek, D., Nowak, G., and Zięba, A. (2005). Udział miedzi i magnezu w patogenezie i terapii zaburzeń afektywnych. *Psychiatria Polska*, 39(5).
- [Sramek et al., 2022] Sramek, J. J., Murphy, M. F., and Cutler, N. R. (2022). Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression. *Dialogues in clinical neuroscience*.

- [Stahl, 2013] Stahl, S. M. (2013). *Mood Disorders and Antidepressants: Stahl's Essential Psychopharmacology*. Cambridge University Press.
- [Starke, 1981] Starke, K. (1981). α -adrenoceptor subclassification. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 88*, pages 199–236.
- [Stolerman and Price, 2015] Stolerman, I. P. and Price, L. H. (2015). *Encyclopedia of psychopharmacology*. Springer.
- [Stone et al., 2007] Stone, E. A., Quartermain, D., Lin, Y., and Lehmann, M. L. (2007). Central $\alpha 1$ -adrenergic system in behavioral activity and depression. *Biochemical pharmacology*, 73(8):1063–1075.
- [Subramanian et al., 2005] Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43):15545–15550.
- [Sugrue, 1983] Sugrue, M. F. (1983). Chronic antidepressant therapy and associated changes in central monoaminergic receptor functioning. *Pharmacology & Therapeutics*, 21(1):1–33.
- [Swaminathan, 2003] Swaminathan, R. (2003). Magnesium metabolism and its disorders. *The Clinical Biochemist Reviews*, 24(2):47.
- [Szewczyk et al., 2010] Szewczyk, B., Poleszak, E., Sowa-Kućma, M., Wróbel, A., Słotwiński, S., Listos, J., Wlaź, P., Cichy, A., Siwek, A., Dybała, M., et al. (2010). The involvement of nmda and ampa receptors in the mechanism of antidepressant-like action of zinc in the forced swim test. *Amino Acids*, 39(1):205–217.
- [Tóth, 2011] Tóth, K. (2011). Zinc in neurotransmission. *Annual review of nutrition*, 31:139–153.
- [Tully et al., 2018] Tully, P. J., Peters, R., Pérès, K., Anstey, K. J., and Tzourio, C. (2018). Effect of ssri and calcium channel blockers on depression symptoms and

- cognitive function in elderly persons treated for hypertension: three city cohort study. *International psychogeriatrics*, 30(9):1345–1354.
- [Turturici et al., 2011] Turturici, G., Sconzo, G., and Geraci, F. (2011). Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochemistry research international*, 2011.
- [Unnerstall et al., 1985] Unnerstall, J. R., Fernandez, I., and Orensanz, L. M. (1985). The alpha-adrenergic receptor: radiohistochemical analysis of functional characteristics and biochemical differences. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22(5):859–874.
- [Vázquez-Prado et al., 2003] Vázquez-Prado, J., Casas-González, P., and García-Sáinz, J. A. (2003). G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein–protein interactions. *Cellular signalling*, 15(6):549–557.
- [Vetulani et al., 1984] Vetulani, J., Antkiewicz-Michaluk, L., Rokosz-Pelc, A., and Pilc, A. (1984). Alpha up-beta down adrenergic regulation: a possible mechanism of action of antidepressant treatments. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 36(2-3):231–248.
- [Vetulani and Nalepa, 1996] Vetulani, J. and Nalepa, I. (1996). The effect of chronic administration of amitriptyline on the effects of subsequent electroconvulsive treatment on responsiveness of $\alpha 1$ - and β -adrenoceptors in the rat cortical slices. *Journal of neural transmission*, 103(3):363–376.
- [Vetulani and Nalepa, 2000] Vetulani, J. and Nalepa, I. (2000). Antidepressants: past, present and future. *European journal of pharmacology*, 405(1-3):351–363.
- [Vetulani and Sulser, 1975] Vetulani, J. and Sulser, F. (1975). Action of various antidepressant treatments reduces reactivity of noradrenergic cyclic amp-generating system in limbic forebrain. *Nature*, 257(5526):495–496.
- [Voineskos et al., 2020] Voineskos, D., Daskalakis, Z. J., and Blumberger, D. M. (2020). Management of treatment-resistant depression: challenges and strategies. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 16:221.

- [Wang et al., 2018] Wang, H., Xu, J., Lazarovici, P., Quirion, R., and Zheng, W. (2018). camp response element-binding protein (creb): a possible signaling molecule link in the pathophysiology of schizophrenia. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11:255.
- [Wang et al., 2004] Wang, J. Q., Tang, Q., Parelkar, N. K., Liu, Z., Samdani, S., Choe, E. S., Yang, L., and Mao, L. (2004). Glutamate signaling to ras-mapk in striatal neurons. *Molecular neurobiology*, 29(1):1–14.
- [Wang et al., 2021] Wang, M., Yang, L., Chen, Z., Dai, L., Xi, C., Wu, X., Wu, G., Wang, Y., and Hu, J. (2021). Geniposide ameliorates chronic unpredictable mild stress induced depression-like behavior through inhibition of ceramide-pp2a signaling via the pi3k/akt/gsk3 β axis. *Psychopharmacology*, 238(10):2789–2800.
- [Wang et al., 2007] Wang, S.-y., Song, Y., Xu, M., He, Q.-h., Han, Q.-d., and Zhang, Y.-y. (2007). Internalization and distribution of three α 1-adrenoceptor subtypes in hek293a cells before and after agonist stimulation. *Acta pharmacologica sinica*, 28(3):359–366.
- [White et al., 2019] White, C. W., da Silva Junior, E. D., Lim, L., and Ventura, S. (2019). What makes the α 1a-adrenoceptor gene product assume an α 1l-adrenoceptor phenotype? *British journal of pharmacology*, 176(14):2358–2365.
- [Widecka, 2007] Widecka, K. (2007). Leki α 1-adrenolityczne i działające centralnie. *Nadciśnienie tętnicze*, 11(Supp.A):1–26.
- [Wikberg, 1978] Wikberg, J. E. (1978). Pharmacological classification of adrenergic α receptors in the guinea pig. *Nature*, 273(5658):164–166.
- [Xing et al., 2013] Xing, Y., He, J., Hou, J., Lin, F., Tian, J., and Kurihara, H. (2013). Gender differences in cms and the effects of antidepressant venlafaxine in rats. *Neurochemistry International*, 63(6):570–575.
- [Xu et al., 2017] Xu, Y., Ma, L., Jiang, W., Li, Y., Wang, G., and Li, R. (2017). Study of sex differences in duloxetine efficacy for depression in transgenic mouse models. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11:344.

- [Yamawaki et al., 1998] Yamawaki, S., Kagaya, A., Tawara, Y., and Inagaki, M. (1998). Intracellular calcium signaling systems in the pathophysiology of affective disorders. *Life sciences*, 62(17-18):1665–1670.
- [Yang et al., 1999] Yang, M., Ruan, J., Voller, M., Schalken, J., and Michel, M. C. (1999). Differential regulation of human $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 359(6):439–446.
- [Yeh et al., 2017] Yeh, C.-C., Fan, Y., Xu, Y., Yang, Y.-L., Simpson, P. C., and Mann, M. J. (2017). Shift toward greater pathologic post-myocardial infarction remodeling with loss of the adaptive hypertrophic signaling of alpha1 adrenergic receptors in mice. *PLoS One*, 12(12):e0188471.
- [Zhang et al., 2021] Zhang, J., Simpson, P. C., and Jensen, B. C. (2021). Cardiac $\alpha 1a$ -adrenergic receptors: emerging protective roles in cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 320(2):H725–H733.
- [Zhu et al., 2000] Zhu, H., McElwee-Witmer, S., Perrone, M., Clark, K., and Zilberstein, A. (2000). Phenylephrine protects neonatal rat cardiomyocytes from hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 7(9):773–784.
- [Zieba et al., 2000] Zieba, A., Kata, R., Dudek, D., Schlegel-zawadzka, M., and Nowak, G. (2000). Serum trace elements in animal models and human depression: Part iii. magnesium. relationship with copper. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 15(8):631–635.
- [Zoncu et al., 2011] Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D. M. (2011). mtor: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1):21–35.
- [Zuscik et al., 2000] Zuscik, M. J., Sands, S., Ross, S. A., Waugh, D. J., Gaivin, R. J., Morilak, D., and Perez, D. M. (2000). Overexpression of the $\alpha 1b$ -adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. *Nature medicine*, 6(12):1388–1394.

Spis rycin

1.1	Układ noradrenergiczny w mózgu człowieka i myszy	16
1.2	Główny szlak sygnałowy aktywowany za pośrednictwem α_1 -AR .	19
1.3	Rys historyczny pierwszych leków przeciwdepresyjnych	26
1.4	Podstawowe grupy leków przeciwdepresyjnych	28
1.5	Transmisja synaptyczna i mechanizmy działania leków przeciwde- presyjnych	29
3.1	Kasety ekspresyjne plazmidów użytych do transfekcji	43
3.2	Schemat eksperymentu oceniającego wpływ przedłużonej ekspozycji na działanie LPD na aktywację α_1 -AR	49
4.1	Aktywność metaboliczna komórek $\alpha 1A$ -AR i $\alpha 1B$ -AR	67
4.2	Akumulacja fosforanu inozytolu przez komórki $\alpha 1A$ -AR i $\alpha 1B$ - AR w odpowiedzi na działanie agonistów i antagonistów	68
4.3	Krzywe saturacyjne wiązania radioliganda dla komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR	70
4.4	Akumulacja wtórnych przekazników przez komórki $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ - AR i $\alpha 1D$ -AR w wyniku działania leków przeciwdepresyjnych . .	73
4.5	Akumulacja wtórnych przekazników przez komórki $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ - AR i $\alpha 1D$ -AR w wyniku działania leków przeciwdepresyjnych (24 h)	76
4.6	Akumulacja wtórnych przekazników przez komórki $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ - AR i $\alpha 1D$ -AR w wyniku działania leków przeciwdepresyjnych (120 h)	78
4.7	Aktywność metaboliczna komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR po ekspozycji na działanie leków przeciwdepresyjnych	80

4.8	Przykładowe wagi myszy w czasie trwania eksperymentu	81
4.9	Przykładowe obrazy autoradiograficzne mózgu myszy ABD-KO (bregma +1,70 mm)	83
4.10	Przykładowe obrazy autoradiograficzne mózgu myszy ABD-KO (bregma -1,34 mm)	84
4.11	Gęstość α_1 -AR, α_2 -AR i β -AR w mózgu myszy ABD-KO	85
4.12	Poziom wybranych neuroprzekazników i ich metabolitów w pod- wzgórzu	87
4.13	Przykładowe obrazy białkowych macierzy apoptotycznych	88
4.14	Poziom ekspresji białek apoptotycznych w hipokampie	90
4.15	Poziom mRNA genów <i>ADRA1A</i> , <i>ADRA1B</i> i <i>ADRA1D</i> w korze przedczołowej	93
4.16	Wpływ genotypu i wpływ działania leków przeciwdepresyjnych na profil ekspresji genów w hipokampie	95
4.17	Analiza ontologiczna genów regulowanych w wyniku działania mil- nacipranu w hipokampie	97
4.18	Wpływ genotypu i działania milnacipranu na profil ekspresji ge- nów w hipokampie	98
4.19	Poziom fosforylacji i ekspresji białek ERK1 i ERK2 w hipokampie samców	101
4.20	Poziom fosforylacji i ekspresji białek Akt i GSK-3 β w hipokampie samców	102
4.21	Poziom fosforylacji i ekspresji białek ERK1 i ERK2 w hipokampie samic	105
4.22	Poziom fosforylacji i ekspresji białek Akt i GSK-3 β w hipokampie samic	106
4.23	Poziom wapnia, magnezu, miedzi i cynku we wzgórzu samców	109
4.24	Poziom wapnia, magnezu, miedzi i cynku we wzgórzu samic	110

Spis tabel

1.1	Podział receptorów adrenergicznych	17
3.1	Linie komórkowe wykorzystane w badaniach <i>in vitro</i>	43
3.2	Leki przeciwdepresyjne wykorzystane w badaniach <i>in vitro</i>	47
3.3	Skład mieszanin PCR w procesie genotypowania myszy	52
3.4	Sekwencje starterów użytych w procesie genotypowania myszy	53
3.5	Parametry reakcji PCR w procesie genotypowania myszy	53
3.6	Odczynniki wykorzystane w badaniach autoradiograficznych	55
3.7	Liczebność grup eksperymentalnych w badaniach <i>in vivo</i>	58
3.8	Skład mieszaniny reakcyjnej w procesie RT-PCR	60
3.9	Parametry reakcji RT-PCR	60
3.10	Skład mieszaniny reakcyjnej w procesie qRT-PCR	61
3.11	Sekwencje starterów użytych w procesie qRT-PCR	61
3.12	Parametry reakcji qRT-PCR	61
3.13	Przeciwciała pierwszorzędowe wykorzystane do immunodetekcji białek	64
4.1	Odpowiedź komórek $\alpha 1A$ -AR i $\alpha 1B$ -AR na działanie agonistów	67
4.2	Odpowiedź komórek $\alpha 1A$ -AR i $\alpha 1B$ -AR na działanie antagonistów	69
4.3	Parametry wiązania radioliganda dla komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR	71
4.4	Odpowiedź komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR na działanie leków przeciwdepresyjnych	72
4.5	Kolejność leków przeciwdepresyjnych w zależności od nasilenia ich wpływu na podtypy α_1 -AR	74

4.6	Odpowiedź komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR na działanie leków przeciwdepresyjnych (24 h)	77
4.7	Odpowiedź komórek $\alpha 1A$ -AR, $\alpha 1B$ -AR i $\alpha 1D$ -AR na działanie leków przeciwdepresyjnych (120 h)	79
4.8	Lista białek oznaczanych na macierzach apoptotycznych	89
4.9	Zmiany ekspresji genów <i>ADRA1A</i> , <i>ADRA1B</i> i <i>ADRA1D</i> w korze przedczołowej	94
5.1	Podsumowanie eksperymentów dotyczących efektów leków przeciwdepresyjnych w modelach <i>in vitro</i>	116