

Streszczenie pracy doktorskiej

Wstęp

Najważniejszym neuroprzekaźnikiem hamującym w mózgu dorosłych ssaków jest kwas γ -aminomasłowy (GABA). Neuroprzekaźnik ten aktywuje receptory metabotropowe i jonotropowe. Te ostatnie (GABA_ARs), zbudowane są z 5 podjednostek otaczających anionoselektywny por. GABA_ARs charakteryzują się dużym zróżnicowaniem strukturalnym oraz funkcjonalnym. Są one modulowane przez szereg czynników egzo- i endogennych. Rozróżnia się dwie formy inhibicji GABAergicznej: fazową i toniczną. Hamowanie fazowe (synaptyczne) odpowiada za szybką transmisję sygnału z jednego neuronu do drugiego oraz zachodzi za pośrednictwem receptorów zlokalizowanych w obrębie synapsy i zbudowanych głównie z podjednostek: $\alpha_{1/2/3}\beta_{2/3}\gamma_2$. Hamowanie toniczne reguluje pobudliwość sieci neuronalnej poprzez wpływ na opór wejścia błony komórkowej i związane jest z receptorami zlokalizowanymi pozasynaptycznie, o składzie: $\alpha\beta$, $\alpha_5\beta_{1/2/3}\gamma_2$ oraz $\alpha_{1/4/6}\beta_{1/2/3}\delta$.

Cel pracy

Badania nad nowymi modulatorami, głównie selektywnymi podjednostkowo, są obecnie jednym z kluczowych zagadnień farmakologii GABA_ARs. Obfitym źródłem związków oddziałujących z GABA_ARs są rośliny. Celem rozprawy doktorskiej była analiza wpływu dwóch związków pochodzenia naturalnego: α -tujonu (α -tj) oraz falkarinolu (faOH) na GABA_ARs. Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że epileptogenne działanie α -tj (występującego m.in. w bylicy piołun) jest związane z blokowaniem GABA_ARs. Jednak brak było danych na temat selektywności tego związku względem poszczególnych typów receptorów, odpowiadających za inhibicję fazową i toniczną oraz specyficzności jego wiązania z GABA_AR. Specyficzność oddziaływania α -tj z GABA_AR postanowiono sprawdzić poprzez porównanie wpływu związku o zbliżonej budowie strukturalnej - dihydroumbellulonu (2H-umb) na prądy GABAergiczne, mierzone w hodowli neuronalnej. FaOH jest związkiem występującym w m.in. marchewce i należy do grupy alkoholi poliacetylenowych. Związki wchodzące w skład tej grupy są silnymi modulatorami GABA_ARs (np. oenantotoksyna) i z łatwością przekraczają barierę krew-mózg. FaOH ma szerokie prozdrowotne właściwości, lecz jego wpływ na transmisję hamującą nigdy nie był badany. Co ciekawe, związek o zbliżonej strukturze – falkarindiol – moduluje odpowiedzi GABAergiczne. Dlatego też postanowiono zbadać zdolność faOH do modulacji GABA_ARs.

Materiały i metody

Pomiary elektrofizjologiczne wykonywano z zastosowaniem techniki *patch-clamp* (pomiar prądu przy ustalonym napięciu) z zastosowaniem szybkiej perfuzji, pozwalającej na efektywną aplikację agonisty i badanych związków. Pomiary prądów przeprowadzano w hodowli neuronalnej z hipokampu szczura, jak również z zastosowaniem rekombinowanych receptorów o ściśle określonym składzie ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$, $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_1\beta_2\delta$ oraz $\alpha_4\beta_2\delta$), ekspresjonowanych w linii komórkowej HEK293.

Wyniki

We wszystkich badanych typach receptorów α -tujon redukował amplitudę prądów wywołanych egzogenną aplikacją GABA oraz spowalniał kinetykę odpowiedzi prądowych. Największy efekt obserwowano w przypadku receptorów $\alpha_1\beta_2\delta$. Prąd toniczny mierzony w hodowli neuronalnej również był w znacznym stopniu zredukowany przez α -tujon. Natomiast 2H-umb nie wpływał na odpowiedzi GABAergiczne. Falkarindiol w przypadku receptorów

$\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ powodował zwiększenie odpowiedzi prądowej, czemu towarzyszył blok zależny od dawki. W przypadku receptorów $\alpha_1\beta_2$ odpowiedzi prądowe były redukowane, a w przypadku receptorów $\alpha_1\beta_2\delta$ następowało nieodwracalne, wielokrotne wzmocnienie odpowiedzi prądowych, czemu towarzyszyło pojawienie się nieobecnego w warunkach kontrolnych ubytku prądu w czasie aplikacji agonisty z faOH – parametru związanego z desensytyzacją receptora.

Wnioski

Mechanizm modulacji receptorów GABA_A przez α -tujon jest zbliżony dla wszystkich badanych typów receptorów ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$, $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_1\beta_2\delta$ oraz $\alpha_4\beta_2\delta$), lecz stwierdzono różnice ilościowe. Opiera się on na allosterycznym oddziaływaniu z miejscem (lub miejscami) wiążącymi, co skutkuje zmniejszeniem aktywności receptora (uwidocznionym jako redukcja amplitudy prądów wywołanych), wynikającej z upośledzenia procesu bramkowania receptora (zmiany w kinetyce narostu prądu i jego ubytku w czasie aplikacji agonisty), bez oznak tzw. bloku otwartego kanału. Ze względu na fakt, że α -tujon i dihydroumbellulon (związek o bardzo podobnej budowie strukturalnej co α -tujon) dzielą wspólne właściwości fizykochemiczne i sposób oddziaływania z błoną komórkową, obserwacja, że dihydroumbellulon praktycznie nie wpływał na GABA_AR, wskazuje na specyficzność oddziaływania α -tujonu z GABA_AR, chociaż miejsce (miejsca) jego działania pozostają nieznane. Fakt, że receptory $\alpha_1\beta_2\delta$ były modulowane przez α -tujon w większym stopniu niż $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ czy $\alpha_4\beta_2\delta$, wskazuje, że na wrażliwość danego receptora na ten związek wpływa nie tylko obecność podjednostki δ , ale również rodzaj podjednostki α . Pomiar prądu tonicznego w hodowli neuronalnej potwierdza jego większą wrażliwość na α -tujon, niż w przypadku prądów synaptycznych i odpowiedzi prądowych wywołanych wyższymi stężeniami GABA. Co więcej, wpływ α -tujonu na prąd toniczny był porównywalny z tym, wywieranym na receptory $\alpha_1\beta_2\delta$. Warto podkreślić, że receptory te występują w interneuronach hippokampalnych i związane są z inhibicją toniczną. Całościowy efekt wywierany przez ten związek na transmisję hamującą polega na jej zmniejszeniu poprzez znaczną redukcję hamowania tonicznego oraz poprzez redukcję prądów przewodzonych przez receptory związane z fazową (synaptyczną) formą inhibicji.

Efekt modulacji receptorów GABA_A przez falkarinol jest różny w zależności od typu receptora z jakim oddziałuje ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$, $\alpha_1\beta_2$, lub $\alpha_1\beta_2\delta$) i silnie zależy od podjednostki (β_2 , γ , δ) dopełniającej pentamer, w skład którego wchodzi dwie podjednostki α_1 i dwie podjednostki β_2 . Falkarinol wpływa na wiązanie agonisty jak również na procesy bramkowania receptorów $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$, przy czym w wyższych stężeniach związek ten jest dodatkowo blokerem otwartego kanału tychże receptorów (postępująca redukcja amplitudy zależna od dawki i liczby aplikacji falkarinolu). W przypadku receptorów $\alpha_1\beta_2$ otrzymane wyniki sugerują, że mechanizm działania falkarinolu jest oparty na modulacji etapu wiązania agonisty oraz procesów bramkowania, lecz blok otwartego kanału nie występuje. W przypadku receptorów $\alpha_1\beta_2\delta$, falkarinol w średnich i wysokich stężeniach, poza wielokrotnym zwiększaniem amplitudy prądów wywołanych, powodował ujawnianie się makroskopowej desensytyzacji. Jest to bardzo interesująca obserwacja ze względu na fakt, że w warunkach kontrolnych, w prądach przewodzonych przez ten typ receptorów, makroskopowa desensytyzacja nie występuje. Otrzymane wyniki sugerują, że poza wpływem na wiązanie agonisty, falkarinol ma również duży wpływ na procesy bramkowania receptora $\alpha_1\beta_2\delta$. Ze względu na zróżnicowany wpływ

tego związku na różne typy receptorów GABA_A, całościowy efekt falkarinolu jest trudny do określenia. Przy niskich dawkach falkarinol wzmacnia prądy synaptyczne, a przy wysokich prowadzi do ich zmniejszenia w wyniku bloku otwartego kanału. Wysokie dawki falkarinolu zmniejszają prąd toniczny przewodzony przez receptory $\alpha_1\beta_2$, ale za to wielokrotnie zwiększają prąd toniczny przewodzony przez receptory $\alpha_1\beta_2\delta$ (który to typ receptorów jest bardziej dominujący). Toteż wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że również przy wyższych stężeniach GABA falkarinol będzie *per saldo* wzmacniał aktywność GABAergiczną.