

Depresja staje się powoli problemem społecznym, szczególnie w tzw. krajach wysoko rozwiniętych gdzie postęp techniczny, a co za tym idzie stawiane przed nami nowe wyzwania i konkurencja na rynku pracy, nasilają stres życia codziennego. Lekarze podstawowej opieki zdrowotnej borykają się coraz częściej ze zgłaszanych przez pacjentów przypadkami różnorodnych dolegliwości o nieustalonym podłożu (tzw. chorób somatycznych), których dalsza diagnostyka prowadzi do kwalifikacji leczenia w kierunku zaburzeń lękowych czy depresyjnych. Niestety, pomimo ponad 50 lat jakie upłynęło od wprowadzenia pierwszego leku przeciwdepresyjnego, w dalszym ciągu depresja jest chorobą trudno poddającą się terapii. Współcześnie stosowane leki przeciwdepresyjne (LPD), niezależnie od mechanizmu działania, posiadają jedną zasadniczą wadę: wymagają długotrwałego stosowania (rzędu kilku tygodni) zanim pojawią się pierwsze odczucia poprawy. Co więcej, w tym wstępnym okresie poprzedzającym remisję (cofnięcie objawów) bądź nawet całkowite wyleczenie, epizody depresyjne mogą się nasilać a ucierpią niepożądanymi efektami z towarzyszącym stosowaniu LPD znaczna część wielu pacjentów do kontynuowania terapii. Jakby tego było mało, trzeba pamiętać, że około 30% pacjentów wykazuje całkowitą oporność na farmakoterapię depresji, niezależnie od prób doboru różnych leków.

Depresja to schorzenie dotyczące ośrodkowego układu nerwowego, czyli mózgu. Mózg zbudowany jest z komórek nerwowych – neuronów, które komunikują się poprzez przekazywanie sobie między innymi sygnałów chemicznych w postaci neuroprzekazników. Neuroprzekazniki syntetyzowane w neuronach, uwalniane z jednego neuronu do wstępnego szczeliny synaptycznej (międzyneuronalnej), a następnie oddziałują na receptory zlokalizowane na sąsiednim neuronie. Po „wykonaniu” swojej „pracy” neuroprzekaznik jest usuwany ze szczeliny synaptycznej. Na takiej samej zasadzie odbywa się przekazywanie sygnałów w obrębie mózgu, w sytuacji pobudzenia stresowej sytuacji, odbieranej ze środowiska przez nasze zmysły. Nie znamy dokładnej przyczyny depresji, choć istnieje wiele prawdopodobnych hipotez, dotyczących jej etiologii – m.in. wspomniany wcześniej stres (bardziej ten przewlekły, długotrwały, kumulujący się w ciągu życia), traumatyczne przeżycia z dzieciństwa, procesy zapalne, predyspozycje genetyczne. Wiemy jednak, że za objawy odpowiadają bezpośrednio zaburzenia funkcjonowania neuroprzekazników, głównie noradrenaliny, dopaminy lub serotoniny, których poziom w mózgu chorego na depresję jest zwykle obniżony. Stąd, mechanizm działania LPD opiera się przede wszystkim na nasileniu neurotransmisji poprzez stymulację albo blokowanie odpowiednich receptorów, hamowanie działania enzymów rozkładających neuroprzekazniki bądź też zapobieganie ich tzw. wychwytowi zwrotnemu ze szczeliny synaptycznej. Wszystkie te strategie mają na celu przywrócenie poziomu neuroprzekaznika do normy i co za tym idzie, zapewnienie prawidłowego funkcjonowania tych części mózgu, które są odpowiedzialne za sterowanie naszymi emocjami.

Skuteczne leczenie depresji pozostaje jednak nadal sprawą otwartą i badania prowadzone zarówno w laboratoriach placówek naukowych jak i firm farmaceutycznych zmierzają do wynalezienia leków o bardziej efektywnym i szybszym działaniu poprzez poszukiwanie nowych, bądź bardziej selektywnych substancji. Trzeba pamiętać, że droga do wprowadzenia nowego leku do lecznictwa jest długa, trudna i wymaga wielu lat badań na poziomie eksperymentalnym, testów klinicznych i wreszcie wdrożenia produkcji komercyjnej. Nasza wiedza na temat mechanizmów przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego poszerzyła się znacznie od czasu wprowadzenia do kliniki wielu współcześnie stosowanych LPD. Poznano szereg istotnych białek ulegających modyfikacji pod wpływem działania LPD, wyodrębniono te metodami farmakologicznymi i genetycznymi szereg nowych podtypów receptorów odpowiedzialnych za modulację efektów działania LPD. M.in. wśród receptorów adrenergicznych grupy alfa(1)-AR, istotnych dla działania noradrenaliny, znane są od lat 90. XX wieku trzy podtypy alfa(1)A-AR, alfa(1)B-AR, alfa(1)D-AR. Pełnią one zróżnicowane funkcje i są dość dobrze opisane, ale w organach obwodowych. Ich działanie w ośrodkowym układzie nerwowym jest wciąż słabo poznane a badania zasadniczo utrudnione i często niewykonalne z uwagi na brak tzw. „narzędzi farmakologicznych”, czyli wysoce specyficznych ligandów (związków chemicznych aktywujących lub hamujących dany receptor) rozróżniających poszczególne podtypy i przenikających do mózgu. Stąd, alternatywnym podejściem jest zastosowanie do badań linii komórkowych oraz genetycznie zmodyfikowanych myszy, w których możliwa jest eliminacja konkretnego podtypu receptora alfa(1)-AR i w ten sposób badanie jego roli poprzez ocenę zaburzeń wywołanych tym zabiegiem. Niniejszy projekt jest oparty na roboczej hipotezie zakładającej zróżnicowany udział podtypów receptora alfa(1)-AR w mechanizmie działania LPD. Sugerujemy to nasze wcześniejsze badania prowadzone na poziomie analizy mRNA kodującego cego podtypy alfa(1)A-AR i alfa(1)B-AR po podaniach imipraminy (popularnego LPD działającego na układ noradrenergiczny), które wykazały odmienną regulację tych podtypów pod wpływem przewlekłego stosowania leku.

Celem projektu jest zatem **zbadanie zaangażowania trzech podtypów (A, B i D) receptora alfa(1)-AR w mechanizmach działania LPD** przy wykorzystaniu:

- **modeli *in vitro*** – linii komórek nadekspresjonujących (czyli wykazujących nadmiar) danego podtypu alfa(1)-AR a na których nie występują pozostałe podtypy;
- **modeli *in vivo*** – myszy z usuniętymi tymi genami (tzw. *knock-out*, KO) kodującymi poszczególne podtypy alfa(1)-AR.

Pierwsza faza projektu (badania na liniach komórkowych) będzie obejmowała określenie, czy i w jaki sposób LPD wpływają na reaktywność podtypów alfa(1)-AR, poprzez ich odpowiedź na agonistów (substancje stymulujące) mierzonych metodami farmakologicznymi (m.in. oznaczenie tzw. wtórnych przekazników oraz poziomu różnych wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych). Równolegle przeprowadzone zostanie tzw. profilowanie ekspresji genów na myszach pozbawionych poszczególnych podtypów alfa(1)-AR (A-KO, B-KO, D-KO), metodą mikromacierzy cDNA w materiale wyizolowanym ze struktur mózgowych szczególnie istotnych dla modulacji odpowiedzi po LPD. Metoda ta polega na przesiewowym zbadaniu praktycznie wszystkich genów danej myszy poprzez oznaczenie kierunku i istotności zmian w ich ekspresji, co zostanie wykonane zarówno w odniesieniu do wpływu na organizm samej mutacji (brak danego podtypu alfa(1)-AR) jak i efektu przewlekłego podania LPD. W przypadku profilowania ekspresji genów nie tylko chodzi o wyodrębnienie konkretnych, poszczególnych genów, których ekspresja ulega modyfikacji, ale o znalezienie całych grup genów (tzw. klastrów) odpowiadających za zmiany w szlakach molekularnych przekazywania sygnału wewnątrz komórki. W tym celu stosuje się zaawansowane narzędzia bioinformatyczne i specjalistyczne oprogramowanie pozwalające określić, czy wywołane zmiany prowadzą do procesów zapalnych, apoptotycznych

(zaprogramowanej śmierci komórkowej) czy też odwrotnie, ich kierunek może skutkować nasileniem mechanizmów obronnych. Oczywiście, takie procesy wykryte na poziomie mRNA nie muszą mieć przełożenia na zmiany funkcjonalne, prowadzące do rzeczywistych efektów odpowiedzi komórkowej. Podobnie, wyniki badań *in vitro* przeprowadzone na sztucznym modelu linii komórkowej z modulacją konkretnego podtypu alfa(1)-AR nie oddadzą całego spektrum interakcji w złożonym organizmie wielokomórkowym. Niemniej jednak, wyniki uzyskane w tej części projektu posłużą do wyznaczenia dalszych etapów, realizowanych już na poziomie badania ekspresji białek kluczowych dla określenia zmian w ciękach molekularnych wyodrębnionych po pierwszej fazie projektu i które są rozwijane jako istotne punkty uchwytu dla działania LPD (m.in. kinazy aktywowanych miogenami, czynnika transkrypcyjnego CREB, kinazy syntazy glikogenu). Należy pamiętać, że same receptory alfa(1)-AR również stanowią punkt uchwytu dla wielu LPD, które mają bezpośrednio powinowactwo do tych receptorów. Dotychczasowe badania nad wpływem LPD na podtypy alfa(1)-AR są jednak nieliczne.

Eksperymenty wykonane w ramach niniejszego projektu dostarczą nowych danych i pozwolą zdefiniować bardziej precyzyjnie funkcje podtypów alfa(1)-AR w odpowiedzi na LPD. Dalsza dogłębna identyfikacja molekularnych szlaków wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w mechanizmy działania LPD może wpłynąć na lepsze poznanie czynników odpowiedzialnych za etiologię depresji jak i przyczyni się do rozwoju nowych strategii w projektowaniu przyszłych, bardziej efektywnych terapii.