VÝZKUMNÝ ZÁMĚR 1 - SYNTÉZA LÁTEK OVLIVŇUJÍCÍCH GLUTAMÁTERGNÍ NEUROTRANSMISI

Výzkumný cíl 1 - Identifikace a stanovení farmakologických vlastnosti nových potenciálních léčiv inhibujících NMDAr

Aktivita 1 – Neurofarmakologie potenciálních léčiv duálně modulující cholinergní a glutamátergní systém

Cílem aktivity je návrh, syntéza a biologické testování strukturně odlišných skupin sloučenin s duálním efektem využitelných při výzkumu neurodegenerativních onemocnění. Zejména se jedná o tyto dílčí aktivity:

1) Metodou organické syntézy příprava a analýza nových duálních sloučenin cílených do CNS s vhodnými fyzikálně chemickými vlastnostmi. Předpokládá se příprava třech nových řad těchto látek. Design látek se bude odvíjet ze současně získávaných dat a jejich strukturně- aktivitní evaluace.
2) Screeningové *in vitro* hodnocení připravených sloučenin, popis mechanismu účinku na NMDA receptory a acetylcholinesterázu.
3) Následné *in vivo* hodnocené nejperspektivnějších kandidátů. Kromě klasických testů pro potenciální léčiva (akutní toxicita a biodostupnost) bude studována farmakodynamika vybraných kandidátů.
4) Vyhodnocení vztahů mezi biologickou aktivitou a strukturou (SAR) a zpětná vazba pro design nových duálně působících látek.

Vzhledem k mnohočetné etiologii neurodegenerativních chorob je v posledních letech výzkum v oblasti vývoje léčiv zaměřen na takové struktury, které jsou schopné zasáhnout několik cílů současně. Kombinace léčiv v klinické praxi není nový jev. Využívá se zejména terapie MMT (multiple-medication therapy), což je kombinace několika léčiv užívajících se na konkrétní onemocnění s odlišným mechanismem účinku a tzv. multiple-compound medication (MCM), kdy je do jedné lékové formy inkorporováno několik různých léčiv. Z hlediska vývoje nových léčiv je zajímavá strategie založená na předpokladu, kdy stačí pouze jedna sloučenina, která by byla schopna zasáhnout několik cílů zároveň. Jedná se o tzv. **multi-target-directed ligands** (MTDLs).

Jedním z nejběžněji používaných přístupů v této oblasti je modifikace molekulární struktury inhibitorů acetylcholinesterasy (AChE) tak, aby poskytla doplňující biologické vlastnosti vhodné pro léčbu AD. V tomto případě se bude jednat o **kombinaci inhibitoru acetylcholinesterasy (AChE) a antagonisty *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDAR).** Obě skupiny léčiv dnes představují standardní léčbu AD. Na základě předběžných dat (viz níže) budou navrženy a syntetizovány nové molekuly, které ovlivňují oba cíle najednou. Tyto duálně účinné látky tak budou schopné současně inhibovat AChE a dále zabraňovat nadměrnému přísunu vápníku do nervových buněk. Kombinace těchto účinků je tak velmi slibná jak z pohledu základního výzkumu nových potenciálních léčiv, tak z pohledu jejich možné aplikovatelnosti.

Řešitelský kolektiv vychází z poznatků, které získal v této oblasti v posledních letech, kdy se povedla připravit derivát standardního inhibitoru AChE - takrinu (kodové označení K1395), která byla navržena tak, aby modulovala oba zmíněné systémy.

Vyvinuli jsme derivát založený na skeletu takrinu, který je účinným inhibitorem AChE v podmínkách *in vivo* (tabulka 1) jak v centrálním, tak v periferním kompartmentu a selektivní a zároveň potentním inhibitorem na GluNl/GluN2B receptorech (tabulka 2). Mechanismus vazby na receptory GluN1/GluN2B byl zkoumán specifickými mutacemi v *N*-koncových doménách a ukázalo se, že kromě oblasti póru receptoru GluN1/GluN2B se specificky váže na vazebné místo ifenprodilu, Naše data tedy ukazují, že tento derivát takrinu inhibuje receptory GluN1/GluN2B způsobem, který není nezávislý na napětí, zatímco na receptorech GluN1/GluN2A se sloučenina váže pouze na oblast pórů napěťově závislým způsobem. Předpokládáme, že tento kombinovaný mechanismus účinku by mohl být slibnou strategií pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, vaskulární dmence, ischemické poškození CNS či komorbiditní psychiatrické nemoci, neboť kombinuje oba současné symetrické přístupy - cholinergní stimulaci a glutaminergní inhibici.

Tabulka 1: Afinita k AChE a in vivo účinnost látky KXXX

Potkan Wistar, i.p.	Dávka*	% inhibice AChE	
		Krev	Mozek
K1395	10% LD50 (16 mg/kg)	0	0
	20% LD50 (32 mg/kg)	7,4	4,2

*LD_{50} = **160,4** (96,5 – 233,3) mg/kg, *i.p.*

Tabulka 2: Antagonistické působení KXXX na různé GLU podjednotky

podjednotka	**mV**	**IC50**	**SEM**	**n**	**H**	**SEM**
2A	-60	7,44	0,49	6	1,87	0,10
	-20	13,23	0,86	6	1,59	0,07
	40	26,27	1,26	5	1,74	0,06
2B	-60	1,66	0,14	14	1,06	0,05
	-20	1,95	0,11	8	1,08	0,06
	40	2,01	0,14	10	1,12	0,09

Dalším krokem bude behaviorální hodnocení terapeutických účinků lead compounds ve vhodných animálních modelech. Druhotným cílem bude posouzení potenciálních vedlejších účinků lead compounds na intaktní zvířata.

Budeme studovat účinek lead compound (analogy K1395) v modelu bilaterální hipokampální léze vyvolané stereotaxickou aplikací NMDA. Tento model představuje animální model excitotoxicky vyvolané chronické neurodegenerace neuronů, provázené závažnou neuroinflamací, a specifickýmih změnami podjednotek u NMDA a GABAA receptorů. Výsledné neuroprotektivní účinky budou hodnoceny na behaviorální a histochemické úrovni (Rambousek et al., 2016). Dále se zaměříme na analýzu v modelu ischemického poškození mozku. Použijeme osvědčené modely okluze ligatury karotidy a cerebrálních tepen pomocí endothelinu-1 (120 pmol); (Karhunen et al., 2005). Účinek látek na učení a paměť bude měřen prostřednictvím Morrisova vodního bludiště, radiálního bludiště, po nichž budou následovat histochemické studie. Rozsah poškození mozku bude posouzen imunohistochemicky, podobně jako u prvního modelu. Během následných experimentů se zaměříme na zkoumání účinků těchto farmak v behaviorálních modelech sociální prohry (social defeat) a tryptofanové deplece (modely deprese).

Dále budeme zkoumat účinek na chování podobné schizofrenii v animálním modelu. Schizofrenii podobné chování u potkanů bude vyvoláno podáním dizocilpinu (MK-801) v dávce 0,1 mg/kg. Kognitivní výkon potkanů bude testován v behaviorálních etestechch, jako je open field, Morrisovo vodní bludiště a prepulzní inhibice úlekové reakce. Dále budeme hodnotit vliv látek na procesy spojené se stárnutím. Zvířata budou testována v testech open field a passive avoiudance a Morrisova vodního bludiště přibližně ve věku 5, 9 a 18 měsíců.

Paralelně bude probíhat práce zaměřená na zjištění případných vedlejších účinků lead compound u intaktních zvířat, a to na jejich kognitivní a senzomotorické funkce. Ke zhodnocení možných neočekávaných behaviorálních dopadů bude provedena testovací baterie kognitivních a motorických úkolů. Tyto testy budou seskupeny do funkčních kategorií. Nejprve budeme zkoumat účinek na reflexy a senzorickou oblast. Dále pak bude posouzeny případné nespecifické účinky. Percepce a pohybová aktivita bude hodnocena v Morrisově vodním bludišti pomocí viditelné platformy. Tato zkouška bude použita k prozkoumání zraku, motivace ke správnému provedení úkolu a lokomočních funkcí subjektu. Lokomoční funkce budou dále testovány dobře zavedenými testy Rotarod a beam walking (chůze po la´tce).

Závěrem bude studováno senzorimotorické zpracování informací v testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce (PPI). V tomto testu krátké prezentaci vezvířat spojení těchto dvou zvuků vyvolává reakci sníženého úlekového reflexu.

Zapojené subjekty:

1) Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta – doc. PharmDr. Kamil Musílek, PhD
2) NUDZ – PharmDr. Ondřej Soukup PhD, RNDr. Karel Valeš PhD
3) Fyziologický Ústav AVČR: Mgr. Martin Horák PhD

Literatura:

1) Bubenikova-Valesova V, et al. 2009. Int J Neuropsychopharmacol. 12(7):873-83.
2) Karhunen H, et al. 2005. Neurochem Res. 30(12):1529-42.
3) Rambousek L, et al. 2016. Neuropharmacology. 105:594-606.
4) Vales K, et al. 2006. Neurosci Res. 55(4): p. 383-8.

Aktivita 2 – Biologické vlastnosti nových duálních molekul ovlivňujících excitabilitu CNS

Cílem této aktivity je návrh, syntéza a biologické testování strukturně odlišných skupin sloučenin s duálním efektem využitelných při výzkumu epileptických encefalopatií. Na rozdíl od aktivity 1 bude návrh látek vycházet z in silico metod molekulového modelování (docking, virtuální screening apod.). Průběh tedy řešení zahrnuje zejména tyto dílčí aktivity:

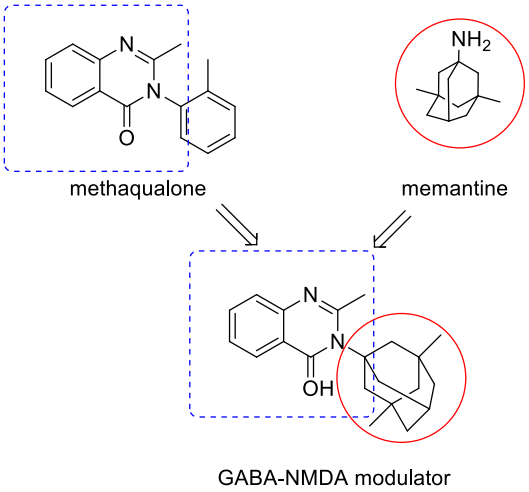
1) Rešerše dané problematiky a návrh struktur za pomocí metod molekulového modelování.
2) Metodou organické syntézy příprava a analýza nových duálních sloučenin cílených do CNS s vhodnými fyzikálně chemickými vlastnostmi. Předpokládá se příprava dvou nových řad těchto látek.
3) Screeningové *in vitro* hodnocení připravených sloučenin, popis mechanismu účinku na NMDA a GABAa receptorech.
4) Následné *in vivo* hodnocené nejperspektivnějších kandidátů. Kromě klasických testů pro potenciální léčiva (akutní toxicita a biodostupnost) bude studována farmakodynamika vybraných kandidátů.
5) Vyhodnocení vztahů mezi biologickou aktivitou a strukturou (SAR) a zpětná vazba pro design nových duálně působících látek.

Alosterická modulace GABAA a NMDA/AMPA receptorů představuje terapeuticky zajímavý biologický cíl. GABAa a glutamátové receptory jsou zodpovědné za excitačně-inhibiční rovnováhu mozku. Výsledky z preklinických a klinických studií podporují potenciální účinnost těchto látek jako nové třídy farmak pro léčbu epilepsie, deprese nebo úzkosti. Mohly by také postrádat psychotomimetické i kognitivní vedlejší účinky a predikuje se u nich snížený potenciál pro zneužívání.

Teorii duálního působení látek využívá také tato aktivita. V tomto případě se jedná o návrh a syntézu molekul kombinující agonistický účinek na gabaergní systém, konkrétně GABAA receptory s antagonistickým účinek vůči *N*-methyl-D-aspartátovým (NDMA) receptorům zejména vůči izoformě obsahující NR2B podjednotku. Modulace GABAA a NMDA či AMPA receptorů představuje terapeuticky zajímavý cíl, protože GABAA a glutamátové receptory jsou zodpovědné za excitačně inhibiční rovnováhu mozku a využitelné jsou v léčbě epileptických encefalopatií, afektivních poruch a řady dalších neuropsychiatrických onemocnění Výsledky preklinických a klinických studií podporují potenciální účinnost těchto sloučenin jako nové třídy sloučenin pro léčbu epilepsie, deprese nebo úzkosti.

V praxi se kombinací těchto vlastností vyznačuje felbamát, jehož přínos je však značně snižován výrazným hepatotoxickými vlastnostmi a rizikem vzniku fatální aplastické anemie. Další sloučeniny (např. methaqualon), které modulují receptory glutamatergické a γ-aminobutyrové kyseliny (GABA) jsou neurosteroidy, což jsou endogenní regulátory mozkové excitability. Bohužel, pouze omezený počet sloučenin s tímto jedinečným dvojím mechanismem účinku je v klinické praxi k dispozici (pouze felbamát) a nově připravené látky s tímto mechanismem by byly velmi žádaným jak z pohledu základního tak aplikovaného výzkumu.

V rámci předkládané aktivity byla navržena hybridní struktura, u které předpokládanáme synergickou modulaci GABA a NMDA receptorů. Strukturní aspekty takovéto sloučeniny vychází z methaqualonu, který zvyšuje aktivitu GABA receptorů s memantinem, který působí jako antagonista NMDA receptorů (Obr. 1).



Obr. 1. Návrh nového modulátoru GABA-NMDA receptorů.

Epileptické encefalopatie jsou jedním z příkladů možné aplikace těchto léků. Pacienti trpící touto závažnou chorobou od raného dětství mají velmi nepříznivou prognózu. V současnosti pro tyto syndromy ani jejich modely neexistuje žádná specifická terapie.

Epileptické záchvaty budou vyvolány ve dvou věkových skupinách – u 12 a 25 dnů starých potkanů. Tyto dvě věkové skupiny byly vybrány podle zrání hematoencefalické bariéry (dozrává u 25ti denních potkanů) a věkově specifické flexní konvulze vyvolané NMDA u 12ti denních, ne však u 25ti denních zvířat. Tyto flexní konvulze jsou všeobecně přijímány jako model flexních záchvatů u nemluvňat.

Použity budou dva experimentální modely vyvolávající křeče s odlišným mechanismem působení – pentetrazol (PTZ, antagonista GABAA receptorů) v dávce 100 mg/kg s.c., a N-methyl-D-aspartát (NMDA, prototypický agonista u jednoho typu ionotropních glutamátových receptorů). Dávky NMDA budou v obou věkových skupinách rozdílné kvůli významnému vývojovému poklesu citlivosti na tento přípravek.

Některé antiepileptická farmaka potenciačně působící na GABAa receptorech jsou vůči těmto záchvatům okrajově účinné. Chtěli bychom syntetizovat a studovat vliv farmak s pozitivním působením na GABAa receptorech a současně s antagonistickým působením na ionotropní glutamátové receptory typu NMDA popř. AMPA. Oba typy glutamátových receptorů mění složení svých podjednotek během postnatálního zrání, což by mohlo vést k vývoji věkově specifických antikonvulzních léků.

Alosterická modulace GABAa a NMDA/AMPA receptorů představuje terapeuticky zajímavý biologický cíl. GABAa a glutamátové receptory jsou zodpovědné za excitačně-inhibiční rovnováhu mozku. Výsledky z preklinických a klinických studií podporují potenciální účinnost těchto látek jako nové třídy farmak pro léčbu epilepsie, deprese nebo úzkosti. Mohly by také postrádat psychotomimetické i kognitivní vedlejší účinky a predikuje se u nich snížený potenciál pro zneužívání.

Zapojené subjekty:

- Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta – doc. PharmDr. kamil Musílek, PhD.
- NUDZ – PharmDr. Jan Korábečný PhD, RNDr. Karel Valeš PhD
- Fyziologický Ústav AVČR: Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.