

mgr inż. Piotr Pankiewicz

**Rozwój innowacyjnych, małowzrostkowych agonistów TrkB
w terapii chorób układu nerwowego**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Kalita-Bykowska

Promotor pomocniczy: dr Jerzy Pieczykolan

Pracę wykonano w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Marcelego Nenckiego w Warszawie oraz Laboratoriach Celon Pharma. S.A.



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa, 2022 r.

Słowa kluczowe: BDNF, agoniści TrkB, rozwój leku

Keywords: BDNF, TrkB agonists, drug development

Wykonanie niniejszej pracy możliwe dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez:

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

(Doktorat Wdrożeniowy 50//DW/2017/01/1)

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

(InnoNeuroPharm POIR.01.02.00-00-0020/17-00; akronim TrackB)

Szczególne podziękowania chciałbym skierować do osób, bez których ta praca by nie powstała:

Moim Promotorem: dr hab. Katarzynie Kalicie-Bykowskiej oraz dr. Jerzemu Pieczykolanowi dziękuję za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie realizowania pracy doktorskiej oraz motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą.

Doktorowi Maciejowi Wieczorkowi dziękuję za możliwość wykonania pracy doktorskiej w firmie Celon Pharma S.A.

Mikołajowi Matłocze dziękuję za inspiracje do badań, pomoc w planowaniu doświadczeń, cenne uwagi (nie tylko) merytoryczne oraz motywację do realizacji celów.

Byłym i obecnym członkom grupy Neuro dziękuję za naukowe dyskusje, krytyczne spojrzenie na wyniki badań oraz pomoc w jasnym formułowaniu myśli naukowej.

Wszystkim byłym i obecnym współpracownikom z działu Badań Przedklinicznych Celon Pharma, w szczególności osobom zaangażowanym w projekt TrackB dziękuję za pomoc w zakresie technik eksperymentalnych, przygotowanie niniejszego manuskryptu oraz czysto naukową atmosferę w pracy.

Koleżankom i Kolegom z zespołu Chemii Medycznej dr. Rafała Moszczyńskiego-Pętkowskiego za inspirującą współpracę i realizację projektu TrackB, a w szczególności dr. Marcinowi Szybińskiemu za niezliczone dyskusje naukowe oraz niekończące się pomysły

Mojej Rodzinie za nieustające wsparcie, wiarę i wyrozumiałość oraz motywację do działania.

A także:

Wszystkim kolegom i koleżankom z Celon Pharma zaangażowanym w realizację projektu TrkB.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	5
STRESZCZENIE.....	8
ABSTRACT.....	10
SPIS TABEL.....	12
SPIS RYCIN.....	13
WYKAZ SKRÓTÓW.....	14
1. WSTĘP.....	17
1.1. Identyfikacja potrzeby medycznej.....	17
1.2. Biologia BDNF.....	19
1.2.1. Ekspresja BDNF i najważniejsze mechanizmy regulatorowe.....	20
1.2.2. Synteza i dojrzewanie BDNF.....	21
1.3. Rodzina receptorów Trk.....	24
1.4. Biologia receptora TrkB.....	24
1.4.1. Warianty, występowanie i charakterystyka strukturalna receptora TrkB.....	24
1.4.2. Mechanizm aktywacji receptora TrkB i transdukcji sygnału.....	27
1.4.2.1. Zmiany konformacyjne.....	27
1.4.2.2. Ścieżki sygnałowe kontrolowane aktywnością TrkB.....	29
1.5. Zaburzenia interakcji BDNF-TrkB w chorobach neuropsychiatrycznych na przykładzie depresji.....	33
1.6. Proces rozwoju nowego leku.....	36
1.7. Odkrycie małowcząsteczkowych agonistów TrkB jako potencjalnych leków... ..	37
2. CEL PRACY.....	41
3. MATERIAŁY I METODY.....	42
3.1. Cząsteczki wpływające na aktywność receptora TrkB.....	43
3.2. Badania przesiewowe z użyciem metody mikroskalowej termoforezy kapilarnej.....	43
3.2.1. Przygotowanie białka exTrkB do badań.....	43
3.2.2. Procedura mikroskalowej termoforezy kapilarnej.....	44
3.3. Elektroforeza natywna.....	45
3.4. Hodowle linii komórkowych.....	46
3.4.1. Linie komórkowe użyte w doświadczeniach oraz warunki ich hodowli.. ..	46
3.4.2. Różnicowanie komórek linii SH-SY5Y z użyciem kwasu retinowego.... ..	47

3.5.	Badanie aktywności receptora TrkB metodą ELFI.....	48
3.6.	Analiza ścieżek sygnałowych	49
3.6.1.	Przygotowanie próbek białkowych oraz oznaczanie stężenia białka metodą BCA	49
3.6.2.	Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	50
3.6.3.	Western blotting.....	51
3.7.	Badanie właściwości cytoprotekcyjnych związków	52
3.8.	Badania <i>in vivo</i>	53
3.8.1.	Przebieg eksperymentu oraz pozyskanie materiału do badań	53
3.8.2.	Oznaczanie stężenia związków na potrzeby analizy farmakokinetycznej	54
3.8.3.	Analiza farmakodynamiczna	55
3.9.	Badanie selektywności związku.....	56
3.10.	Analiza statystyczna.....	56
4.	WYNIKI.....	57
4.1.	Przedmiot badań: biblioteka związków oraz małowcząsteczkowe związki referencyjne.....	57
4.2.	Badania przesiewowe w celu identyfikacji związków oddziałujących z zewnątrzkomórkową domeną receptora TrkB (exTrkB)	59
4.2.1.	Zastosowanie metody mikroskalowej termoforezy kapilarnej w układzie <i>single-point</i> w celu wstępnej selekcji związków wykazujących oddziaływanie z exTrkB	59
4.2.2.	Określenie stałej dysocjacji (K_d) dla wyselekcjonowanych związków małowcząsteczkowych.	60
4.3.	Ocena zdolności związków do aktywacji receptora TrkB w układzie ortosterycznego agonisty.....	63
4.4.	Badanie aktywności związków referencyjnych w modelu allosterycznej modulacji TrkB	66
4.5.	Określenie zdolności związków referencyjnych do indukowania dimeryzacji exTrkB.....	67
4.6.	Analiza aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od TrkB w modelach <i>in vitro</i> po traktowaniu referencyjnymi związkami małowcząsteczkowymi	69
4.6.1.	Model linii komórkowej SN56 T48 z nadekspresją receptora TrkB	69
4.6.2.	Model różnicowanej SH-SY5Y z zaindukowaną nadekspresją TrkB	73
4.7.	Ocena właściwości cytoprotekcyjnych referencyjnych związków małowcząsteczkowych.....	77
4.8.	Badania farmakologiczne <i>in vivo</i> nad 7,8-DHF.....	80

4.8.1. Analiza profilu farmakokinetycznego po doustnym i dożylnym podaniu związku 80	
4.8.2. Analiza farmakodynamiczna <i>ex vivo</i> w tkankach mózgowych myszy po doustnym podaniu związku.	83
4.9. Określenie selektywności 7,8-DHF względem szerokiego panelu celów molekularnych.....	85
5. DYSKUSJA.....	87
6. WNIOSKI.....	103
7. BIBLIOGRAFIA.....	104
DOROBEK PUBLIKACYJNY DOKTORANTA	128
ZAŁĄCZNIKI	129
OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ	140

STRESZCZENIE

Opracowanie efektywnych metod leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego, bez narażenia pacjentów na działania niepożądane stanowi główne wyzwanie dla współczesnej neuropsychofarmakologii. Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), za pośrednictwem receptora o aktywności kinazy tyrozynowej dla BDNF (TrkB), odpowiada za prawidłowy rozwój i funkcjonowanie układu nerwowego. Z uwagi na dobrze udokumentowaną rolę BDNF w patofizjologii chorób ośrodkowego układu nerwowego postuluje się, że modulacja szlaków sygnałowych BDNF-TrkB z użyciem małocząsteczkowych agonistów TrkB może przynieść znamienne efekty terapeutyczne.

W niniejszej pracy podjęto próbę identyfikacji małocząsteczkowych agonistów receptora TrkB. Opracowana na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej tzw. „platforma badawcza” polegała na wykorzystaniu odpowiednich technik przesiewowych oraz testów funkcjonalnych do identyfikacji cząsteczek- potencjalnych agonistów TrkB spośród biblioteki związków o zróżnicowanych chemotypach. W badaniach określono stopień wiązania i interakcji cząsteczek z receptorem, zbadano ich zdolność do ortosterycznej aktywacji receptora TrkB oraz ścieżek sygnałowych *in vitro*, a także sprawdzono ich właściwości protekcyjne. Pomimo dużego zaangażowania w prowadzone prace badawczo-rozwojowe nie udało się zidentyfikować cząsteczek o pożądanych cechach agonisty TrkB.

W pracy dokonano także szczegółowej charakterystyki związków o postulowanej lub udokumentowanej w literaturze aktywności względem receptora TrkB. Otrzymane w ramach tej pracy rezultaty ,pokazują, że związki te nie wykazują właściwości agonistów TrkB, zarówno na poziomie interakcji z receptorem jak i funkcjonalnym. Dla najszerszej opisanego z tej grupy związków 7,8-dihydroksyflawonu (7,8-DHF) przeprowadzono badania selektywności *in vitro* oraz farmakologiczne badania *in vivo*. Wyniki wskazują na niekorzystny profil farmakokinetyczny cząsteczki i na brak aktywności 7,8-DHF zarówno względem TrkB jak i innych ścieżek molekularnych w mózgu u myszy. Ponadto wykazano że 7,8-DHF w warunkach *in vitro* wykazuje zdolność do interakcji z wieloma celami molekularnymi, co świadczy o niskiej selektywności związku względem TrkB.

Wyniki niniejszej pracy wskazują na to, że badane związki referencyjne, w tym 7,8-DHF nie aktywują receptora TrkB, przez co dane literaturowe na temat aktywności tych cząsteczek powinny być ostrożnie interpretowane, z uwzględnieniem szerszego kontekstu funkcjonalnego. Niemniej jednak, opracowana na potrzeby niniejszej rozprawy

platforma do badań przesiewowych może zostać z powodzeniem zastosowana w przyszłych projektach związanych z poszukiwaniem kandydatów na lek.

ABSTRACT**Development of novel, small molecular TrkB agonists as potential therapeutic in treatment of central nervous system disorders.**

Effective treatment of neuropsychiatric diseases without exposing patients to adverse effects is the main challenge for contemporary neuropsychopharmacology. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through interaction with the TrkB receptor is responsible for the development and correct functioning of the nervous system. Due to the well-documented role of BDNF in the pathophysiology of central nervous system diseases, it is postulated that modulation of the BDNF-TrkB signalling pathway using low molecular weight TrkB agonists may offer therapeutic effects.

This study aimed to identify small-molecular compounds that act as a TrkB receptor agonists. The screening platform development in this work consisted of the use of appropriate screening techniques and functional assays to identify potential TrkB agonist molecules from a library of compounds with diverse chemotypes. Molecules with different chemotypes were selected using a screening platform developed within this project. The screening included examination of binding and interaction with the TrkB receptor, determination of orthosteric TrkB and downstream signalling pathway activation, as well as assessment of their neuroprotective properties. Despite efforts and conducted research, it was impossible to identify molecules with desired properties for a TrkB agonist.

This work also presents a detailed characterization of compounds with the postulated or documented activity against TrkB. The obtained results showed that tested compounds do not exhibit TrkB agonist properties, both in terms of interaction with receptor and functional properties. Moreover, *in vitro* selectivity and *in vivo* pharmacological studies were conducted for the 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF) which is a best-studied compound postulated to be a TrkB agonist. The results demonstrated the unfavourable pharmacokinetic profile of 7,8-DHF, the lack of activity against TrkB and downstream molecular pathways in the murine brain. Moreover, 7,8-DHF interacted with multiple molecular targets proving to have poor selectivity.

The results of this study indicate that the tested reference compounds, including 7,8-DHF, do not activate the TrkB receptor; therefore the reported pharmacological activity

of these molecules should be interpreted carefully in a broad functional context. Nevertheless, the screening platform developed in this work can be successfully used in future projects related to the search for drug candidates.

SPIS TABEL

Tabela 1. Skład buforów i roztworów stosowanych w doświadczeniach i metodach. ..	42
Tabela 2. Materiały i odczynniki stosowane przy hodowlach linii komórkowych.	46
Tabela 3. Lista przeciwciał stosowanych w doświadczeniach Western blot.....	52
Tabela 4. Podział zwierząt na grupy eksperymentalne.....	53
Tabela 5. Lista związków referencyjnych opisanych w literaturze jako agoniści TrkB.	58
Tabela 6. Wartości K_d dla związków referencyjnych, które wyznaczono z zastosowaniem techniki MST.	62
Tabela 7. Wartości EC_{50} określone dla związków referencyjnych.....	64
Tabela 8. Podsumowanie wyników badań dla analizowanych związków referencyjnych oraz BDNF.....	80
Tabela 9. Parametry farmakokinetyczne 7,8-DHF oraz jego metabolitów w mózgu oraz osoczu myszy po dożylnym (i.v.) i doustnym (p.o.) podaniu związku.	83
Tabela 10. Wyniki selektywności 7,8-DHF względem różnych celów molekularnych.	86
Tabela Z1. Struktury chemiczne związków małowcząsteczkowych.....	129
Tabela Z2. Wyznaczone wartości stałej dysocjacji (K_d) z użyciem mikroskalowej termoforezy kapilarnej.....	133
Tabela Z3. Szczegółowe wyniki selektywności 7,8-DHF względem różnych celów molekularnych..	134

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat obrazujący proces dojrzewania białka BDNF.....	22
Rycina 2. Struktura genu i izoform białka TrkB.....	25
Rycina 3. Struktura krystaliczna kompleksu TrkB-d5:NT4/5.	26
Rycina 4. Uproszczony schemat kaskady sygnałowej BDNF-TrkB..	30
Rycina 5. Wstępna identyfikacja związków oddziałujących z zewnątrzkomórkową domeną TrkB (exTrkB)	60
Rycina 6. Wyznaczone wartości stałej dysocjacji (K_d) dla wyselekcjonowanych związków	61
Rycina 7. Ocena zdolności związków do aktywacji receptora TrkB w funkcjonalnym teście in vitro.....	64
Rycina 8. Analiza aktywności związków w modelu allosterycznej modulacji.	67
Rycina 9. Analiza dimeryzacji zewnątrzkomórkowej domeny receptora TrkB indukowanej ligandem.....	69
Rycina 10. Analiza aktywacji ścieżek sygnałowych kontrolowanych aktywnością TrkB w modelu linii komórkowej SN56 T48..	70
Rycina 11. Analiza aktywacji ścieżek sygnałowych oraz ocena specyficzności działania związków w modelu linii komórkowej SN56 T48.	72
Rycina 12. Analiza ścieżki sygnałowej oraz ocena specyficzności związków w modelu różnicowanej linii komórkowej SH-SY5Y.....	75
Rycina 13. Ocena właściwości cytoprotekcyjnych związków w modelu różnicowanej SH-SY5Y.....	78
Rycina 14. Profil farmakokinetyczny 7,8-DHF w modelu mysim..	82
Rycina 15. Analiza farmakodynamiczna w tkankach mózgowych myszy po doustnym podaniu 7,8-DHF.	84

WYKAZ SKRÓTÓW

(PI,3,5)P₂	3,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu
4'-DMA-7,8-DHF	4'-dimetyloamino-7,8-dihydroksyflawon
5-HT_R	receptor serotoninowy
7,8,3'-THF	7,8,3'-trihydroksyflawon
7,8-DHF	7,8-dihydroksyflawon
7H8M-flawon	7-hydroksy-8-metoksyflawon
8H7M-flawon	8-hydroksy-7-metoksyflawon
Akt	kinaza serynowo-treoninowa
ANOVA	(ang. <i>analysis of variance</i>) – analiza wariancji
A_R	receptor adenozynowy
AUC	(ang. <i>area under the curve</i>) – pole pod krzywą
BBB	(ang. <i>blood-brain barrier</i>) – bariera krew-mózg
BDNF	(ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>) – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
BSA	(ang. <i>bovine serum albumin</i>) – albumina surowicy wołowej
BZD	benzodiazepiny
CaMKII	(ang. <i>Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II</i>) – kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny
cAMP	(ang. <i>cyclic adenosine-3',5'-monophosphate</i>) – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
CaRE	(ang. <i>calcium-response element</i>) – czynnik transkrypcyjny będący elementem odpowiedzi na wapń
C_{max}	(ang. <i>maximal concentration</i>) – stężenie maksymalne
COX2	(ang. <i>cyclooxygenase type 2</i>) – cyklooksigenaza 2
CREB	(ang. <i>cAMP responsive element binding protein</i>) – czynnik transkrypcyjny wiążący się do sekwencji CRE
Cys	cysteina
DAG	(ang. <i>diacylglycerole</i>) – diacylglicerol
DMSO	(ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>) – dimetylosulfotlenek

ECD	(ang. <i>extracellular domain</i>) – zewnątrzkomórkowa domena receptora
ELFI	(ang. <i>enzyme-linked fixed cell immunoassay, enzymatyczny</i>) – test immunologiczny na utrwalonych komórkach
ERK	(ang. <i>extracellular-signal-regulated kinases</i>) – kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe, kinazy MAP (MAPK)
exTrkB	(ang. <i>extracellular domain of TrkB</i>) – zewnątrzkomórkowa domena receptora TrkB
FBS	(ang. <i>fetal bovine serum</i>) – płodowa surowica wołowa
FKHRL1	(ang. <i>Forkhead-like transcription factor</i>) – widelec zawierający czynnik transkrypcyjny
FRET	(ang. <i>Förster resonance energy transfer</i>) – technika transferu energii rezonansu fluorescencji
GABA	kwas gamma-aminomasłowy
GSK3β	(ang. <i>glycogen synthase kinase 3 β</i>) – kinaza syntazy glikogenu 3 typu izoformy β
HO-1	(ang. <i>heme oxygenase 1</i>) – Oksygenaza hemowa 1
HRP	(ang. <i>horseradish peroxidase</i>) – peroksydaza chrzanowa
HTS	(ang. <i>high throughput screening</i>) – wysokoprzepustowe badania przesiewowe
<i>i.v.</i>	(łac. <i>intra venas</i>) – podanie dożylnie
ICD	(ang. <i>intracellular domain</i>) – domena wewnątrzkomórkowa
Ig	immunoglobulina
IP₃	trifosforan inozytolu
IRES	(ang. <i>internal ribosome entry site</i>) – wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu w sekwencji mRNA
JNK	(ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>) – kinaza domeny N-końcowej białka Jun
K_d	stała dysocjacji
Leu	leucyna

LTD	(ang. <i>long-term depression</i>) – długotrwałe osłabienie synaptyczne
LTP	(ang. <i>long-term potentiation</i>) – długotrwałe pobudzenie synaptyczne
L-VGCC	(ang. <i>L-type voltage-gated calcium channel</i>) – kanały wapniowe bramkowane napięciem typu L
MAPK	(ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i>) – kinazy aktywowane mitogenami; kinazy MAP
mBDNF	(ang. <i>mature BDNF</i>) – dojrzałe białko BDNF
MMP2/9	(ang. <i>matrix metalloproteinase 2/9</i>) – metaloproteaza zewnątrzkomórkowa 2/9
MST	(ang. <i>microscale thermophoresis</i>) – mikroskalowa termoforeza kapilarna
mTOR	(ang. <i>mammalian target of rapamycin</i>) – ssaczy cel rapamycyny
NAS	N-acetyloserotonina
NF-κB	(ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>) – kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny
NGF	(ang. <i>nerve growth factor</i>) – czynnik wzrostu nerwów
NMDA	kwas N-metylo-D-asparaginowy
NSB	(ang. <i>non-specific binding</i>) – kontrola dla wiązań niespecyficznych w metodzie ELFI
NT-3/4/5	(ang. <i>neurotrophin 3/4</i>) – neurotrofina 3/4
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
p.o	(łac. <i>per os</i>) – podanie doustne
PBS	(ang. <i>phosphate-buffered saline</i>) – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanem
PI3K	(ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>) – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PKA	(ang. <i>protein kinase A</i>) – kinaza białkowa A
PKC	(ang. <i>protein kinase C</i>) – kinaza białkowa C

PLCγ	(ang. <i>phospholipase C γ</i>) – fosfolipaza C typu gamma
RA	(ang. <i>retinoic acid</i>) – kwas retinowy
RTK	(ang. <i>receptor tyrosine kinase</i>).– receptory o aktywności kinazy tyrozynowej
SEM	(ang. <i>standard error of the mean</i>) – błąd standardowy średniej
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa
SPR	(ang. <i>surface plasmon resonance</i>) – powierzchniowy rezonans plazmonów
TB	domena transbłonowa receptora
TBS	(ang. <i>Tris-buffered saline</i>) –roztwór soli fizjologicznej buforowany trisem
Tmax	czas, w którym osiągnięty jest Cmax
TrkB	(ang. <i>tropomyosin receptor kinase B</i>)– receptor o aktywności kinazy tyrozynowej dla BDNF
TrkB-FL	(ang. <i>full-length TrkB</i>) – receptor TrkB o pełnej długości
TrkB-T1	(ang. <i>truncated TrkB</i>) – izoforma receptora TrkB pozbawiona domeny kinazowej
TGX	(ang. <i>tris-glycine extended</i>) – formułacja żeli poliakrylamidowych o przedłużonej stabilności tris-glicyny
Tyr	tyrozyna
UTR	(ang. <i>untranslated region</i>) – rejon mRNA niepodlegający translacji
VR1	(ang. <i>vanilloid receptor 1</i>) – kanał kapsaicyny

1. WSTĘP

1.1. Identyfikacja potrzeby medycznej

Depresja to najczęściej występujące w populacji zaburzenie psychiczne przyczyniające się do obniżenia jakości życia człowieka, a w niektórych przypadkach jest powodem

przedwczesnej śmierci [1,2]. Według najnowszych danych epidemiologicznych, około 350 milionów ludzi na całym świecie doświadcza w swoim życiu epizodów depresyjnych [3,4]. Efektywność leczenia dostępnymi terapiami jest ograniczona, co w częstych przypadkach prowadzi do nawrotów choroby lub manifestacji działań niepożądanych [5,6]. Szacuje się, że w najbliższych latach depresja stanie się jedną z chorób istotnie obciążających system opieki zdrowotnej w wielu krajach [7]. Z uwagi na tak dużą skalę problemu, depresja została objęta strategicznym programem Światowej Organizacji Zdrowia mającym na celu poprawę stanu zdrowia psychicznego populacji, tzw., *World Health Organisation Mental Health Gap Action Programme* [4].

Uważa się, że nieprawidłowa synteza, sekrecja oraz zaburzona sygnalizacja czynników neurotroficznych wywołana m.in. niskim poziomem ekspresji neurotrofin stanowi jeden z patomechanizmów prowadzących do rozwoju chorób neuropsychiatrycznych. Zaburzona homeostaza neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF; ang. *brain-derived neurotrophic factor*) jest wskazywana jako główny element prowadzący do manifestacji zaburzeń depresyjnych [8–10]. Według tej teorii, przyczyną choroby są zmiany strukturalne w obszarach mózgu, które odpowiadają za odczuwanie emocji oraz za zdolności poznawcze [11–13]. Wykazano, że u pacjentów z depresją dochodzi do zmian neurodegeneracyjnych w hipokampie, korze przedczołowej oraz jądrze migdałowym, co koreluje z obniżoną ekspresją genów na poziomie mRNA (matrycowe RNA; ang. *messenger RNA*) oraz białka dla BDNF [14–16]. Ponadto, chroniczne stosowanie leków przeciwdepresyjnych – oprócz przywrócenia prawidłowej gospodarki neuroprzekaznikowej – indukuje mechanizmy komórkowe prowadzące do produkcji BDNF, co wpływa na poprawę stanu zdrowia pacjentów [17,18].

Wykazano również, że BDNF uczestniczy w patomechanizmie innych chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN), dla których może stać się podstawą nowej terapii. Jest to związane z neurotroficznym działaniem BDNF wobec szerokiej populacji neuronów ulegających degeneracji w stanach patologicznych, np.: neuronów czuciowych i ruchowych, które są zwyrodnieniowe w przebiegu peryferyjnych neuropatii czuciowych oraz stwardnieniu zanikowym bocznym; neuronów dopaminergicznych istoty czarnej utraconych w chorobie Parkinsona; oraz neuronów cholinergicznych przodomózgowia, które odgrywają istotną rolę w chorobie Alzheimera [19–21]. Niemniej jednak, zastosowanie BDNF w praktyce klinicznej jest mocno ograniczone. Białko BDNF jest słabo

biodostępne po podaniu doustnymi i nie przenika przez barierę krew-mózg [22–25]. Dodatkowo, egzogenny BDNF krążący we krwi jest wysoce niestabilny gdyż podatny jest na proteolizę i wykazuje krótki okres półtrwania [23,26]. Tak niekorzystne właściwości farmakokinetyczne BDNF stwarzają konieczność dostarczenia neurotrofiny bezpośrednio do struktur mózgowych objętych zmianami patologicznymi, co stanowi inwazyjną drogę podania leku i ogranicza możliwość stosowania BDNF jako powszechnej terapii bez konieczności asysty personelu medycznego. Dlatego też alternatywą może być wykorzystanie związków małowcząsteczkowych będących agonistami TrkB (ang. *tropomyosin receptor kinase B*)– receptora dla BDNF. Zdolność związków małowcząsteczkowych do penetracji bariery krew-mózg oraz ich większa stabilność w organizmie po podaniu stanowi ich główną zaletę, co istotnie wspiera słuszność rozwoju związków małowcząsteczkowych jako agonistów TrkB. Terapia oparta o związki małowcząsteczkowe, które naśladowałyby fizjologiczne właściwości BDNF mogłaby stanowić innowację, która zaspokoi potrzeby zarówno medyczne jak i społeczno-ekonomiczne. Oprócz korzyści terapeutycznych, zastosowanie potencjalnego leku opartego na małowcząsteczkowym agonistacie TrkB obniżyłoby koszty społeczne związane z absencją w pracy osób dotkniętych chorobami neuropsychiatrycznymi. Co warte uwagi, terapie oparte o związki małowcząsteczkowe pozwalają na udoskonalenie struktury chemicznej w celu poprawienia właściwości farmakokinetycznych, a to stwarza możliwość opracowania wygodnej dla pacjentów postaci leku np. w formie tabletki.

1.2. Biologia BDNF

Neurotrofiny to termin, określający szereg czynników neurotroficznych oraz czynników wzrostu, które wzmacniają różnicowanie neuronów, indukują proliferację, wpływają na funkcje synaptyczne oraz promują przeżywanie neuronów na różnych etapach rozwoju ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Odkryty w roku 1982, BDNF, czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego, z uwagi na wysoki poziom ekspresji w OUN, jest dominującym neuromodulatorem procesów opisywanych powyżej [27,28]. Dojrzała postać BDNF (mBDNF; ang. *mature BDNF*) wykazuje około 50% homologii w sekwencji aminokwasów z innymi przedstawicielami rodziny czynników neurotroficznych. Należą do nich czynnik wzrostu nerwów (NGF; ang. *nerve growth factor*), neurotrofina 3 (NT-3, ang. *neurotrophin 3*), oraz neurotrofina 4 i 5 (NT4/5; ang. *neurotrophin 4/5*).

BDNF jest w dużej mierze produkowany przez neurony kory nowej, ciała migdałowatego, wzgórza, podwzgórza, przysadki mózgowej i istoty czarnej, gdzie autokrynnie reguluje procesy związane ze wzrostem i rozwojem dendrytów i aksonów. BDNF jest syntetyzowany także przez astrocyty, oligodendrocyty oraz komórki mikrogleju, wyrażając swoje funkcje neurotroficzne i neuroprotektoryjne względem neuronów na drodze regulacji parakrynnnej [29–33]. BDNF jest wykrywalny także w tkankach obwodowych, szczególnie w komórkach śródbłonna, kardiomiocytach, mięśniach gładkich naczyń krwionośnych, białych krwinkach, w których również reguluje procesy cyklu i rozwoju komórkowego [34–39]. Obecność BDNF została potwierdzona także w wielu typach nowotworów mózgu oraz tkanek peryferyjnych, w których indukują proliferację i przyczynia się do progresji nowotworowej [40–42].

1.2.1. Ekspresja BDNF i najważniejsze mechanizmy regulatorowe

U człowieka gen kodujący BDNF składa się z 11 egzonów oraz 9 alternatywnych promotorów regulujących transkrypcję genu *BDNF* [43,44]. Przypuszcza się, że obecność licznych promotorów kontroluje zależną od rodzaju stymulacji ekspresję *BDNF*, umożliwiając komórkom reagowanie na różnorodność bodźców. W ludzkim mózgu transkrypcji ulegają wszystkie egzony *BDNF*, jednakże odbywa się to w różnym stopniu i specyficznie dla danego regionu mózgowia [44].

Transkrypcja *BDNF* zależy od aktywności neuronalnej i potencjału błonowego neuronu. Sygnałem stymulującym do transkrypcji jest m.in. depolaryzacja błony stanowiąca reakcję komórki na zewnętrzny bodziec elektrochemiczny. Dla przykładu, aktywacja receptorów NMDA (N-metylo-D-asparaginy) lub kanałów wapniowych bramkowanych napięciem typu L (L-VGCC, ang. *L-type voltage-gated calcium channel*) prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (Ca^{2+}) i aktywacji transkrypcji genu *BDNF*, głównie z promotora w egzonie IV [45,46]. Podwyższony poziom wapnia w neuronach prowadzi do wzrostu stężenia cyklicznego AMP (cAMP; ang. *cyclic adenosine monophosphate*) oraz aktywacji szlaków kinaz MAPK (kinazy aktywowane mitogenami; ang., *mitogen-activated protein kinases*), PKA (kinaza białkowa A; ang. *protein kinase A*) oraz CaMKII (kinaza białkowa zależna od wapnia/kalmoduliny; ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) [46–48]. Aktywność promotora IV *BDNF* jest silnie stymulowana przez wapń oraz ściśle regulowana przez czynnik transkrypcyjny reagujący na

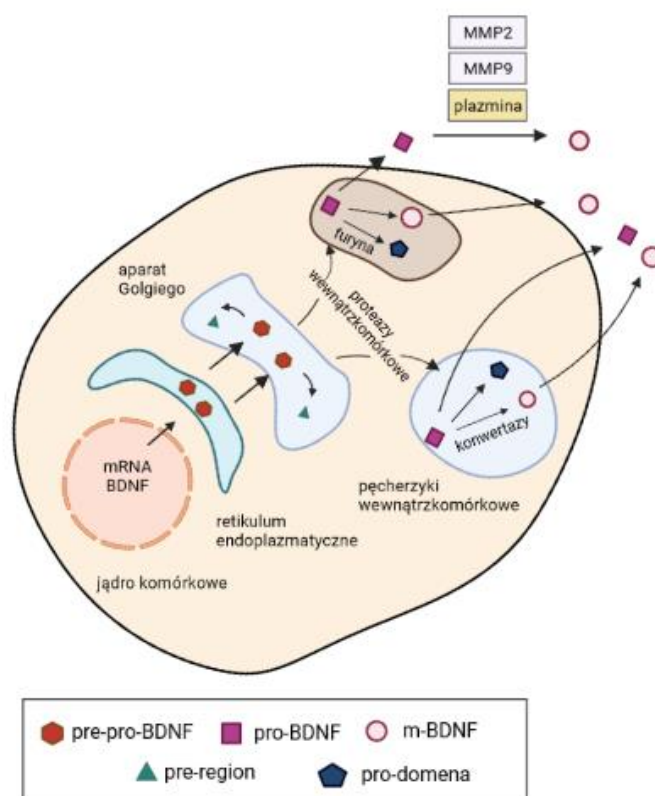
cAMP (CREB; ang. *cAMP response element binding*). Promotor egzonu IV *BDNF* zawiera również elementy odpowiedzi na wapń– CaRE (ang. *calcium- response element*), które razem z CREB pełnią funkcję regulatorową [45,46,49]. Aktywowane wyrzutem wapnia szlaki kinazowe MAPK, PKC oraz CaMKII powodują odpowiednio fosforylację czynników transkrypcyjnych CaRE oraz CREB tworząc kompleks aktywujący promotor, co rozpoczyna sekwencję zdarzeń prowadzących do transkrypcji mRNA *BDNF* w egzonie IV [46].

Alternatywne składanie egzonów (ang. *splicing*) kończy transkrypcję genu białka *BDNF* w dwóch możliwych miejscach poliadenylacji, dając początek dwóm populacjom mRNA *BDNF* o różnej długości, które trafiają do określonych przedziałów neuronalnych [44,50]. Krótkie transkrypty *BDNF* są lokalizowane w ciele komórki gdzie utrzymują podstawową produkcję *BDNF*. Natomiast długie transkrypty *BDNF* kierowane są do dendrytów, gdzie ulegają lokalnej translacji w efekcie pobudzenia neuronalnego [51,52]. *BDNF* powstający z opisanych powyżej długich i krótkich transkryptów jest zlokalizowany głównie perikarionie (59%) gdzie jest magazynowany w gęstych pęcherzykach rdzeniowych (ang. *dense core vesicles*) a tylko w 29% jest ukierunkowany na dendryty [53,54]. Specyficzna translacja kompartmentowa transkryptów *BDNF* jest także kontrolowana przez mikroRNA. Związanie cząsteczek mikroRNA takich jak miR-44 czy Let-7a-3p w regionie zawierającym sekwencje sygnałowe do poliadenylacji, odpowiednio przy długim lub krótkim 3' UTR (ang. *untranslated region*) w cząsteczce mRNA, doprowadza do degradacji transkryptów *BDNF* i negatywnej regulacji synaptogenezy [55–57].

1.2.2. Synteza i dojrzewanie *BDNF*

Synteza i dojrzewanie białka *BDNF* jest procesem wieloetapowym i obejmuje powstanie kilku pośrednich izoform prekursorowych, co zostało przedstawione na Rycinie 1. *BDNF* to silnie zachowane w toku ewolucji białko, zbudowane z 247 aminokwasów, ulegające syntezie i fałdowaniu w retikulum endoplazmatycznym jako białko prekursorowe pre-pro*BDNF* (32-35 kDa). Po translokacji do aparatu Golgiego, sekwencja sygnałowa pre-regionu jest odcinana tworząc izoformę pro*BDNF* (28-32 kDa) [58]. Następnie pro-*BDNF* ulega dalszej obróbce proteolitycznej osiągając formę dojrzałą białka m*BDNF* (13 kDa). Proces dojrzewania na tym etapie może odbywać się zarówno w przestrzeni wewnątrzkomórkowej jak i w macierzy zewnątrzkomórkowej. Dojrzewanie

wewnątrzkomórkowe jest przeprowadzane przez endopeptydazy subtylizyny/keksyny takie jak furyna, bądź za pośrednictwem konwertaz zawartych w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych [59,60]. Dojrzewanie zewnętrzkomórkowe odbywa się za pośrednictwem plazminy oraz metaloproteaz zewnętrzkomórkowych 2 i 9 (MMP2/9; ang. *matrix metalloproteinase 2/9*) [61,62].



Rycina 1. Schemat obrazujący proces dojrzewania białka BDNF. W szlaku wewnątrzkomórkowym sekwencja prekursora pre-proBDNF jest wytwarzana w siateczce endoplazmatycznej i transportowana do aparatu Golgiego. Następnie dochodzi do rozszczepienia i usunięcia sekwencji pre-regionu, co determinuje powstanie niedojrzałej izoformy proBDNF, a dalsze procesowanie i usunięcie pro-regionu prowadzi do powstania dojrzałej neurotrofiny (mBDNF). Wewnątrzkomórkowe procesy -proteolizy zachodzą w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych umożliwiając transport neurotrofiny w obrębie neuronu oraz uwalnianie do przestrzeni zewnętrzkomórkowych. Procesowanie BDNF zachodzi z udziałem proteaz wewnątrzkomórkowych regulowanych przez konwertazy i furyny. W efekcie, zarówno izoformy proBDNF i mBDNF są uwalniane do przestrzeni zewnętrzkomórkowej. Dojrzewanie zewnętrzkomórkowe pro-neurotrofiny jest przeprowadzane z udziałem metaloproteinaz 2 i 9 (MMP2, MMP9) oraz plazminy. Schemat opracowano na podstawie Kowiański i wsp., 2018 [60].

Dojrzałe białko BDNF tworzy stabilne homodimery, które mogą być wydzielane zarówno w szlakach konstytutywnych jak i regulowanych, trafiając do obszarów presynaptycznych i postsynaptycznych neuronów [62,63]. W komórkach neuronalnych, zarówno

proBDNF jak i mBDNF są uwalniane w wyniku depolaryzacji błony komórkowej [54,64]. W tym miejscu należy zaznaczyć, że proBDNF również wykazuje aktywność biologiczną i jest on autonomicznym ligandem, oddziałującym z receptorem p75^{NTR} oraz sortyliną [65,66]. proBDNF może też występować jako białko polimorficzne. Substytucja waliny na metioninę w pozycji 66 (Val66Met) w sekwencji pro-domeny osłabia interakcje proBDNF z receptorem sortylinowym. Mutacja ta nie wpływa na sekwencję aminokwasową dojrzałego białka BDNF, niemniej jednak ma swój wpływ na sortowanie, transport i uwalnianie neurotrofiny w momencie pobudzenia neuronalnego [60,67]. Konsekwencją tych procesów są zmiany morfologiczne neuronów oraz zaburzenia plastyczności synaptycznej. Wykazano korelacje pomiędzy fenotypem Val66Met, a rozwojem zaburzeń poznawczych, lękowych oraz depresyjnych [60,68,69].

proBDNF wykazuje przeciwstawne funkcje w stosunku do dojrzałego BDNF. Wykazano, że proBDNF ma właściwości proapoptotyczne i negatywnie wpływa na architekturę neuronów, co wyraża się poprzez cofanie stożka wzrostu i kurczenie kolców dendrytycznych [70,71]. W konsekwencji, ze względu na zmniejszenie liczby neuronów i pogorszenie funkcji synaps, procesy te przyczyniają się do długotrwałej depresji synaptycznej, co pokazano w neuronach rejonu hipokampa [72–74]. Fizjologiczne znaczenie wszystkich tych pozornie negatywnych procesów można wytłumaczyć redukcją nadmiernej liczby dojrzewających neuronów, eliminacją uszkodzonych lub nieprawidłowo działających komórek, a także likwidacją nieprawidłowych połączeń, które są nieskuteczne podczas kształtowania pamięci czy w innych procesach kognitywnych. Stosunek proBDNF do mBDNF różni się między poszczególnymi etapami rozwoju mózgu i jego regionami. Podczas gdy we wczesnym okresie poporodowym odnotowuje się wyższe stężenie proBDNF, mBDNF przeważa w wieku dorosłym [74].

BDNF odgrywa krytyczną rolę w wielu procesach zachodzących w OUN, zarówno na poziomie komórkowym jak i strukturalnym. Do najważniejszych funkcji należy udział w rozwoju systemu nerwowego poprzez wpływ na różnicowanie oraz wzrost neuronów. BDNF reguluje mechanizmy plastyczności synaptycznej związanej z procesami uczenia się i pamięci oraz funkcji poznawczych, poprzez wpływ na procesy długotrwałego wzmocnienia i osłabienia synaptycznego (LTP; ang. *long-term potentiation*; LTD; ang. *long-term depression*) [66,75]. Ponadto, BDNF pełni funkcje neuroprotektoryjne w stanach stresu komórkowego, związanego np. z ekscytotoksycznością glutaminergiczną [63].

Warunkiem odpowiedzi komórki na działanie BDNF jest związanie czynnika neurotroficznego przez receptor TrkB, który należy do klasy receptorów o właściwościach kinazy tyrozynowej (RTK; ang., *receptor tyrosine kinase*).

1.3. Rodzina receptorów Trk

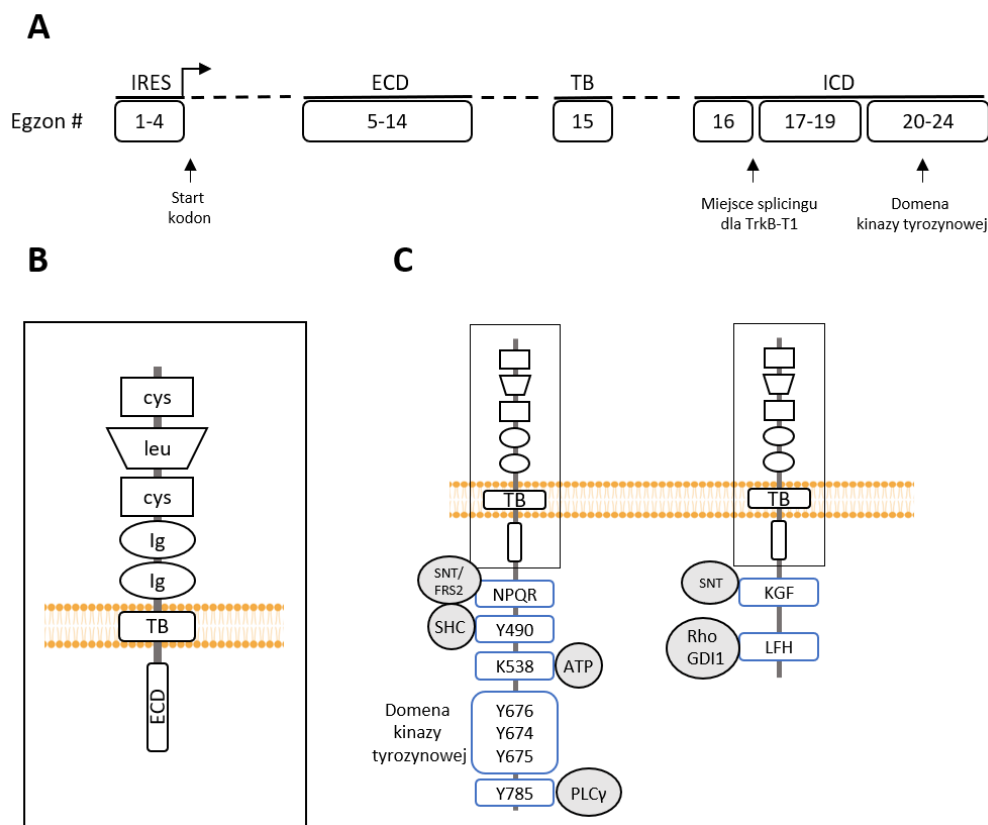
Rodzinę receptorów Trk (ang., *tyrosine receptor kinase*) stanowią białka błonowe posiadające aktywność kinazy tyrozynowej i wiążące czynniki neurotroficzne. Nazwa tychże receptorów wywodzi się od odkrycia onkogenu, kodującego tropomiozynę niemięśniową, połączoną poprzez domenę transbłonową z cytoplazmatyczną kinazą tyrozynową [76]. W konsekwencji proto-onkogen nazwano kinazą związaną z tropomiozyną, dziś powszechnie określaną jako *trkA*. Geny *trkB* oraz *trkC* zostały zidentyfikowane poprzez wysoką homologię do *trkA*. Porównania ich sekwencji ze znanymi wówczas, innymi transbłonowymi kinazami tyrozynowymi wykazały, iż kodują one zupełnie nową klasę powierzchniowych receptorów kinaz tyrozynowych [66,77]. Specyficzny wzorec ekspresji w obrębie układu nerwowego sugerował aktywny udział receptorów Trk w rozwoju i funkcjonowaniu neuronów. Późniejsze badania potwierdziły słuszność tej hipotezy, udowadniając, że czynnik wzrostu nerwów (NGF) wiąże się do TrkA i indukuje aktywność kinazy tyrozynowej [78–80]. Wykazano również, że TrkB oraz TrkC także są receptorami dla czynników neurotroficzych. Neurotrofina 3 wykazuje powinowactwo do receptora TrkC, zaś ligandami dla TrkB są neurotrofina 4 oraz BDNF [75,81,82].

1.4. Biologia receptora TrkB

1.4.1. Warianty, występowanie i charakterystyka strukturalna receptora TrkB

U człowieka receptor TrkB jest kodowany przez gen *NTRK2*, zlokalizowany na chromosomie 9q22, o długości 590 kbp i składa się z 24 egzonów. Korzystając z alternatywnych promotorów, miejsc splicingu i poliadenylacji, z genu *NTRK2* może powstać co najmniej 100 izoform mRNA, które mogą kodować 10 białek [83]. Najpowszechniej występującymi formami w ośrodkowym układzie nerwowym jest białko TrkB o pełnej długości

(TrkB-FL; ang. *full length TrkB*) oraz forma pozbawiona domeny katalitycznej (TrkB-T1, ang., *truncated TrkB*) (Rycina 2) [66,83,84].



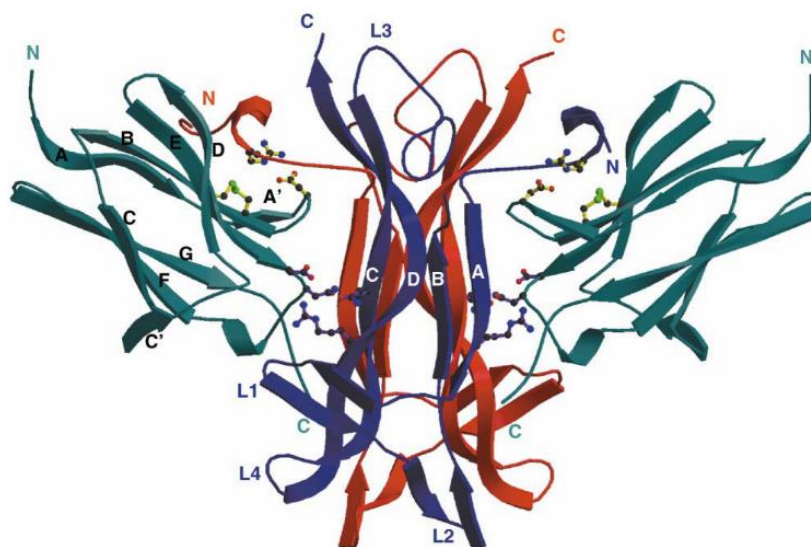
Rycina 2. Struktura genu i izoform białka TrkB. (A) Ekspresja genu *NTRK2* umożliwia powstanie niemal 100 produktów genu z powodu alternatywnego splicingu i miejsc poliadenylacji jego 24 egzonów. Egzony 1–4 zawierają sekwencje IRES (ang. *internal ribosome entry site*– wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu) bogate w G/C. Kodon start dla dwóch najliczniejszych produktów genu, TrkB-FL i TrkB-T1 znajduje się w egzonie 5. Egzony 5–16 są wspólne dla transkryptów TrkB-FL i TrkB-T1. Egzony 5-14 kodują domenę zewnątrzkomórkową (ECD), egzon 15 koduje domenę transbłonową (TB), a egzon 16 koduje konserwatywną domenę wewnątrzkomórkową (ICD) wspólną dla TrkB-FL i TrkB-T1. TrkB-FL ma rozbudowaną domenę wewnątrzkomórkową kodowaną przez egzony 16-24, gdzie egzony 20-24 kodują domenę kinazy tyrozynowej. (B) Konserwatywne domeny białkowe TrkB-FL i TrkB-T1. ECD zawiera 5 domen, w tym 2 regiony bogate w cysteinę (Cys), region bogaty w leucynę (Leu) i dwie domeny Ig-podobne (Ig). Domeny przedstawione w (B) wykazują 100% homologii między izoformami TrkB-FL i TrkB-T1. (C) Struktura domeny wewnątrzkomórkowej TrkB-FL i TrkB-T1. TrkB-FL ma długość 822 aminokwasów i zawiera wiele znanych domen wiążących. TrkB-T1 ma długość 477 aminokwasów i nie zawiera katalitycznej domeny kinazy tyrozynowej. TrkB-T1 zawiera dwie potencjalne domeny wiążące w sekwencji KFG oraz LFH. Opracowano na podstawie Fenner i wsp., 2012 [84].

Domena wewnątrzkomórkowa receptora jest specyficzna dla danego izotypu począwszy od trzynastego aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym. TrkB-FL zawiera złożoną domenę katalityczną bogatą w tyrozynę i miejsca wiązania dla białek Shc i fosfolipazy C typu gamma (PLC γ) [75,84,85]. Krótki, cytoplazmatyczny ogon TrkB-T1 zawiera reszty serynowe oraz sekwencję KFG (lizyna-feniloalanina-glicyna) rozpoznawalną przez białko SNT i sekwencję wiążącą LFH, natomiast pozbawiona jest domeny kinazowej i miejsc wiązania dla białek Shc i PLC γ (Rycina 2C) [65,84].

Układ strukturalny zewnątrzkomórkowej domeny receptorów TrkB-FL i TrkB-T1 jest homologiczny (Rycina 2B). Pięć domen wiążących (D1-D5) zlokalizowanych w części zewnątrzkomórkowej osiąga długość 398 aminokwasów i ulega glikozylacji (Haniu i in., 1995). Sekwencja sygnalizacyjna zlokalizowana przed domeną D1 kieruje i umiejscawia białko receptorowe w błonie komórkowej neuronu [87,88]. Otoczone domenami cysteinowymi regiony bogate w leucynę mają zasadnicze znaczenie w stabilizacji tworzonego kompleksu receptora z ligandem poprzez odpowiednie ukształtowanie konformacji TrkB. Domeny immunoglobulinopodobne (Ig1 i Ig2) odpowiadają za wiązanie liganda [89,90]. Wykazano, że za rozpoznanie liganda w szczególności odpowiedzialna jest domena Ig2, a obecność krótkiej wstawki w tym regionie determinuje preferencje TrkB do wiązania z NT-3/4 lub BDNF [91]. Na Rycinie 3 przedstawiono model strukturalny kompleksu TrkB-d5:NT4/5, ze wskazaniem na miejsca oddziaływań w kieszeni wiążącej domeny Ig2 receptora TrkB [92].

Rycina 3 Struktura krystaliczna kompleksu TrkB-d5:NT4/5. Ortogonalny widok całej struktury kompleksu. Jednostkę kryształu stanowi jeden homodimer NT4/5 związany z dwoma monomerami TrkB-d5. Homodimer NT4/5 jest zabarwiony na czerwono (jeden monomer) i niebiesko (drugi monomer) wraz z adekwatnym oznaczeniem elementów struktury drugorzędowej. TrkB-d5 oznaczono kolorem cyjanowym z zaznaczeniem struktury β -harmonijki. Na żółto pokazano wiązania pomiędzy resztą Arg-11 neurotrofiny NT4/5 z resztami Asp-298, Cys-302 i Cys-345 receptora TrkB, które określają położenie miejsca dla specyficzności interakcji. Na fioletowo zaznaczono wiązania reszt NT-4/5 Gln-94 i Arg-114 z resztami TrkB Asp-349 i Asn-350, które wskazują lokalizację konserwatywnego miejsca oddziaływania. Na podstawie Naylor i wsp., 2002 [92].

(Rycina na następnej stronie)



Po zakończonej translacji w retikulum endoplazmatycznym, białko TrkB jest kierowane do aparatu Golgiego, gdzie ulega dojrzewaniu. Następnie, receptor jest pakowany do pęcherzyków wydzielniczych i kierowany do błony komórkowej na krańcach aksonów bądź dendrytów. Transport TrkB odbywa się wzdłuż mikrotubul, a w proces ten zaangażowane są białka motoryczne z rodziny kinezyn [93,94]. Początkowo uważano, że receptor TrkB jest produkowany jedynie w komórkach nerwowych OUN. Obecnie wiadomo, że TrkB jest także prezentowany na powierzchni błony komórkowej makrofagów, komórek endokrynych, komórek mięśni gładkich i poprzecznie prążkowanych oraz komórek układu immunologicznego [66,95]. Ponadto, TrkB jest także wykrywalny w komórkach nowotworowych raka piersi, płuc, jelita grubego, prostaty, szpiczaka oraz w guzach limfoidalnych [96]. W ośrodkowym układzie nerwowym TrkB jest szeroko rozpowszechniony i ulega syntezie zarówno na etapie rozwoju embrionalnego, jak i u dorosłych osobników [87]. Największą ekspresję TrkB wykazano w części zbitej istoty czarnej, grzbietowych jądrach szwu, polu brzusznej nakrywki, korze frontalnej, hipokampie, mózdzku, podwzgórzu oraz w strukturach narządu wzroku [97,98].

1.4.2. Mechanizm aktywacji receptora TrkB i transdukcji sygnału

1.4.2.1. Zmiany konformacyjne

Związanie liganda z TrkB doprowadza do aktywacji receptora poprzez fosforylację miejsc tyrozynowych w jego domenie wewnątrzkomórkowej. W następstwie tych

procesów dochodzi do transdukcji sygnału i aktywacji szlaków sygnałowych, które wywierają specyficzny efekt funkcjonalny w komórce.

Zgodnie z jednym z postulatów, dimeryzacja RTK (ang. *receptor tyrosine kinase*; receptor kinazy tyrozynowej) w błonie komórkowej jest konieczna, ale niewystarczająca do aktywacji receptora. Istnieją również strukturalne wymagania aby doszło do transfosforylacji pomiędzy dwoma podjednostkami dimeru receptora TrkB [99,100]. Niezbędna jest również odpowiednia orientacja domeny kinazowej w dimerze, która jest osiągnięta dopiero po związaniu liganda, po czym następuje reorganizacja struktury na całej długości receptora jednocześnie [101–103]. Ta teoria została udowodniona eksperymentalnie, gdyż wykazano, że konformacja regionu transbłonowego (TB) ulega zmianie po związaniu liganda, co koreluje ze wzrostem fosforylacji receptora [102,104]. Co więcej, rotacje dimerycznego TB prowadzą do okresowych oscylacji aktywności kinazy co sugeruje, że sama domena katalityczna jest wrażliwa na zmiany strukturalne zachodzące w tym regionie [105]. Istnieje też alternatywny pogląd, który sugeruje, że zmiany strukturalne wywołane przez ligandy nie mogą być propagowane wzdłuż długości RTK, ponieważ łączniki między różnymi domenami są „sztywne” i nieustrukturyzowane [106]. Wykazano bowiem, że domeny ECD oraz ICD mogą zmieniać konformacje niezależnie od siebie [103,107,108].

Znane są dwa modele aktywacji TrkB w kontekście dimeryzacji. Pierwszy z nich zwany modelem kanonicznym, bądź też dyfuzyjnym, zakłada że monomery TrkB dime-ryzują i wzajemnie się aktywują tylko po związaniu liganda. Nie mając skłonności do spontanicznej – wzajemnej interakcji, w przypadku braku liganda pozostają jako monomery [66,109,110]. Zgodnie z drugim postulatem, receptor TrkB tworzy dimery zanim przyłączy się do niego ligand [103]. Z użyciem techniki transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET; ang. *Förster resonance energy transfer*) oraz TrkB sprzężonego z białkiem fluorescencyjnym (eYFP/mTurquoise) wykazano, że obydwa modele są prawdziwe, i zjawiska mogą zachodzić równolegle. W komórkach linii HEK 293 pochodzącej z ludzkich embrionalnych komórek nerki (ang., *human embryonic kidney*), które transfekowano cDNA TrkB, egzogeny receptor TrkB występuje w błonie zarówno w formie monomerycznej jak i dimerycznej, w zależności od poziomu jego ekspresji i zgodnie z prawem masy [99]. Wzrost poziomu ekspresji TrkB może powodować przejście TrkB z populacji monomerycznej do populacji głównie dimerycznej, nawet przy braku liganda.

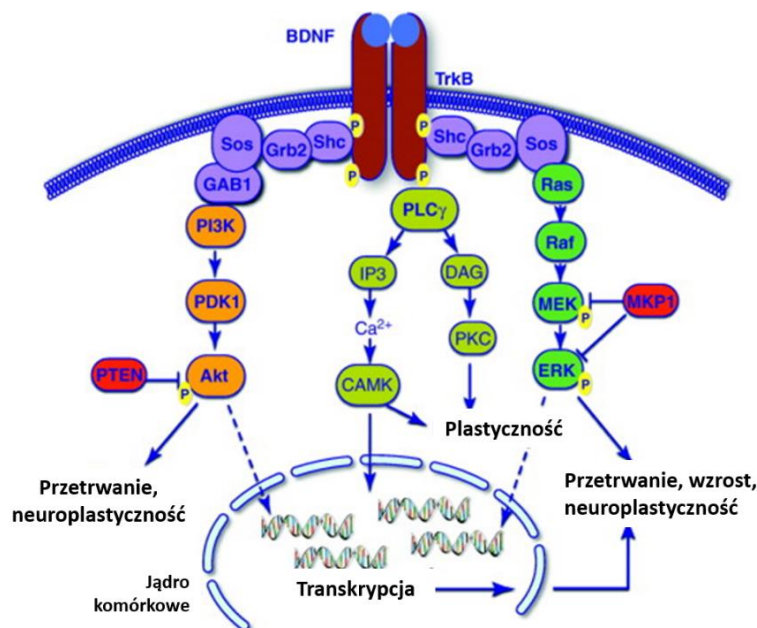
Kiedy ligand wiąże się do wolnego dimeru TrkB prowokuje przejście do strukturalnie odrębnego stanu dimerycznego o większej stabilności, co określono modelem tranzycyjnej aktywacji TrkB [103]. Autorzy podkreślają jednak, że procesy te są dynamiczne a ich pełne zrozumienie wymaga szerszego kontekstu i odniesienia do komórek neuronalnych. Stwierdzenie to wydaje się być uzasadnione, gdyż badania przeprowadzone przez Zahavi i wsp. (2018), na neuronach izolowanych z rdzenia kręgowego sugerują, że TrkB występuje w błonie komórkowej w postaci monomerycznej, a forma dimeryczna TrkB jest obecna jedynie w endosomach [111]. Wyniki tych badań wskazują też na selektywną i specyficzną transdukcję sygnału wewnątrzkomórkowego, w zależności od aktywacji monomeru czy dimeru receptora TrkB [111]. Jak dotąd, jest to pierwsze i jedyne badanie wskazujące na dualny mechanizm działania TrkB i niewątpliwie wymaga dalszej eksploracji, szczególnie w kontekście innych populacji neuronów na różnych etapach ich rozwoju oraz w warunkach *in vivo*.

Niemniej jednak, wydaje się, że uniwersalnym modelem aktywacji receptora jest stan w którym: (i) monomery TrkB mają skłonność do interakcji bocznych i tworzenia dimeru bez obecności liganda; (ii) niezwiązane z ligandem dimery TrkB mają różną stabilność (co za tym idzie – liczba dimerów zależy od sytuacji fizjologicznej); (iii) związanie BDNF do TrkB stabilizuje strukturę dimeru; (iv) związanie liganda wywołuje zmiany strukturalne w dimerze.

1.4.2.2. Ścieżki sygnałowe kontrolowane aktywnością TrkB

TrkB może ulegać fosforylacji w kilku miejscach na wewnątrzkomórkowych resztach tyrozynowych, a fosforylacja poszczególnych z nich prowadzi do aktywacji określonych szlaków sygnałowych. Podwójne reszty tyrozyn 706/707 znajdują się w miejscu autofosforylacji, które są wymagane do osiągnięcia stanu aktywacji TrkB [72,79]. Ufosforylowane tyrozyny (Tyr) w pozycji 515 oraz 816 stanowią miejsce dokowania dla białek efektorowych, które inicjują kaskadę wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. W komórkach neuronalnych scharakteryzowano trzy główne ścieżki sygnałowe związane z aktywacją TrkB: fosfolipazy typu gamma (PLC γ , ang. *phospholipase C γ*); kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphoinositide 3-kinase*), oraz kinaz aktywowanych czynnikami zewnętrznymi (ERK, ang. *extracellular-signal-regulated kinases*– zwane również

kinazami MAP, MAPK) [112]. Na Rycinie 4 przedstawiono schemat kaskady sygnałowej BDNF-TrkB.



Rycina 4. Uproszczony schemat kaskady sygnałowej BDNF-TrkB. Aktywacja receptora TrkB w wyniku związania BDNF prowadzi do pobudzenia wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych PI3K-Akt, PLC γ oraz ERK. Poszczególne etapy transdukcji sygnału opisano szczegółowo w tekście. Schemat opracowano na podstawie Duman i wsp., 2012 [112].

1.4.2.2.1. PLC γ 1

Fosforylacja reszty tyrozynowej znajdującej się najbliżej C-końca (Tyr816) prowadzi do rekrutacji i aktywacji fosfolipazy C typu gamma (PLC γ). Białko PLC γ hydrolizuje 3,5-bisfosforan fosfatydyloinozytoli (PI,3,5)P $_2$ do diacylglicerolu (DAG) oraz trifosforanu inozytoli (IP $_3$). IP $_3$ prowadzi do uwolnienia wewnątrzkomórkowego Ca $^{2+}$, co z kolei aktywuje białka regulatorowe, takie jak kalmodulina, kinazy białkowe zależne od wapnia CaMKII oraz fosfatazy takie jak kalcyneuryna. W następstwie tych zdarzeń, CaMKII indukują fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB, który po translokacji do jądra komórkowego moduluje ekspresję genów [20,113]. Dodatkowo, w wyniku wyrzutu wapnia oraz wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu DAG aktywacji ulega kinaza białkowa C (PKC, ang. *protein kinase C*), która po translokacji do membrany komórkowej aktywuje ścieżkę sygnałową związaną z ERK. Proces ten odbywa się za pośrednictwem małej GTP-azy Ras oraz kanału kapsaicyny (VR1, ang. *vanilloid receptor 1*) [20,114] W kontekście funkcjonalnym, aktywacja ścieżki sygnałowej związanej z PLC γ wpływa na

morfologię komórek neuronalnych powodując wzrost i dojrzewanie neurytów co pozytywnie wpływa na plastyczność synaptyczną [20,63].

1.4.2.2.2. PI3K-Akt

Aktywacja receptora TrkB i fosforylacja tyrozyny 515, znajdującej się najbliżej domeny transbłonowej tworzy miejsce przyłączenia dla białka adaptorowego Shc. Interakcja Shc z TrkB prowadzi do aktywacji kinazy PI3K za pośrednictwem białek Grb2 oraz Gab2. W tym czasie dochodzi również do lokalnej reorganizacji błony komórkowej (fosforylacja fosfolipidów inozytolowych w pozycji 3') [63,115]. W konsekwencji tych procesów białko Akt (kinaza serynowo-treoninowa) ulega translokacji do błony komórkowej i zostaje aktywowane przez PI3K. Prowadzi to do reorganizacji cytoszkieletu oraz zwiększenia translacji białek za pośrednictwem szlaku mTOR (ssaczy cel rapamycyny; ang. *mammalian target of rapamycin*), oraz wzmocnienia wzrostu aksonów poprzez fosforylację i dezaktywację kinazy syntazy glikogenu 3 izoformy β (GSK3 β ; ang. *glycogen synthase kinase 3 β*) [116,117]. Akt promuje przeżywalność neuronów poprzez modulację białek regulatorowych uczestniczących w procesie apoptozy. Indukuje fosforylację proapoptycznego białka Bad co uniemożliwia interakcję z Bcl-xL, dzięki czemu Bcl-xL utrzymuje swoje właściwości antyapoptotyczne, przyczyniając się do zachowania integralności błony mitochondrialnej [65,66]. Dodatkowo, Akt reguluje aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych. Poprzez fosforylację FKHRL1 (widelec zawierający czynnik transkrypcyjny, ang. *forkhead-like transcription factor*) białko Akt indukuje asocjację tego czynnika transkrypcyjnego z białkiem 14-3-3. W konsekwencji dochodzi do sekwestracji FKHRL1 w cytoplazmie, co uniemożliwia na dalszych etapach kaskady aktywację transkrypcji kilku genów, których produkty promują apoptozę [118]. Co więcej, Akt uczestniczy w fosforylacji I κ B powodując jego degradację, skutkuje to uwolnieniem i translokacją do jądra komórkowego kompleksu białkowego NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Aktywacja receptora TrkB pod wpływem BDNF w neuronach hipokampalnych aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który indukuje ekspresję genów wpływających na neuroprotekcję [119].

1.4.2.2.3. ERK

Obok kaskady sygnałowej PI3K-Akt, integracja białka Shc z receptorem TrkB inicjuje wieloetapową ścieżkę sygnałową związaną z kinazami aktywowanymi czynnikami zewnętrznymi ERK (zwanymi również MAP kinazami). Transdukcja sygnału jest zapoczątkowana poprzez fosforylację białka Shc, co prowadzi do interakcji z białkiem wiążącym receptor dla czynnika wzrostu typu 2 (Grb2) w kompleksie z białkiem SOS. W następnym etapie aktywacji białka Ras, za pośrednictwem białka Raf dochodzi do aktywacji kinaz białkowych aktywowanych mitogenami MEK, które powodują fosforylację i przejściową aktywację ERK [72]. Regulacja ścieżki sygnałowej odbywa się na zasadach sprzężenia zwrotnego i ma na celu osłabienie sygnału poprzez fosforylację poszczególnych elementów regulatorowych oraz uruchomienie endogennych fosfataz. Białko ERK pośredniczy w fosforylacji SOS, co powoduje dysocjację kompleksu Grb2-SOS, w efekcie białko Ras nie zostaje aktywowane a ścieżka sygnałowa ulega wyciszeniu [66]. Przedłużona aktywacja ERK wymaga zaangażowania innego białka adaptorowego, Frs2, który podobnie jak Shc jest fosforylowany przez aktywny TrkB. Transdukcja sygnału przebiega podobnie jak w szlaku Shc-Grb2/SOS-Ras, jednakże głównymi białkami adapterowymi oraz sygnałowymi są odpowiednio Crk i Rap1 [66].

Kinazy MAP aktywowane przez Ras i Rap1 mają różne cele molekularne, które współdziałają ze sobą i pośredniczą w transkrypcji genów uczestniczących w różnicowaniu komórek. Wykazano, że ERK5 ale nie ERK1/2 aktywują MEF2, podczas gdy czynnik transkrypcyjny Elk1 jest aktywowany wyłącznie przez ERK1/2. Substratami dla białek ERK1, ERK2 oraz ERK5 jest rodzina kinaz białkowych Rsk, które fosforylują czynnik transkrypcyjny CREB. CREB reguluje ekspresję genów, których produkty są niezbędne do normalnego różnicowania oraz przedłużenia żywotności neuronów zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [65,66].

1.5. Zaburzenia interakcji BDNF-TrkB w chorobach neuropsychiatrycznych na przykładzie depresji

Istnieją dowody wskazujące na bezpośrednią zależność pomiędzy zaburzeniami interakcji BDNF-TrkB, a depresją, co manifestuje się przede wszystkim poprzez zmiany w plastyczności mózgu [60,112].

Neuroplastyczność czy też plastyczność neuronalna, to zdolność układu nerwowego do reorganizacji struktury, funkcji i połączeń neuronalnych w odpowiedzi na zdobywane doświadczenie, czy też czynniki wewnętrzne i zewnętrzne [120,121]. Jest procesem złożonym i obejmuje: zmiany architektury neuronów poprzez wzrost dendrytów, tworzenie nowych połączeń synaptycznych, usuwanie zdegenerowanych neuronów oraz neurogenezę – czyli powstawanie nowych neuronów w obszarach proliferacyjnych mózgu [60,112,120].

Projekcje neuronalne przechodzące przez jądra migdałowe, hipokamp oraz korę czołową determinują zdolność mózgu do tworzenia epizodycznej i deklaratywnej pamięci [122]. Hipokamp to jedna z nielicznych struktur mózgowych, w której zachodzi neurogeneza w wieku dorosłym, odpowiadająca za procesy poznawcze, pamięć oraz regulację nastroju [123,124]. Objawy depresji związane z przeżywaniem negatywnych emocji, problemy z koncentracją, zapamiętywaniem oraz uczeniem się, bezpośrednio korelują ze zmianami anatomicznymi w mózgu. W badaniach pośmiertnych (łac. *post mortem*) u osób z depresją, wykazano zredukowaną objętość hipokampa, w którym wykryto zmniejszoną neurogenezę oraz zmiany w morfologii komórek nerwowych [8,57]. Ponadto, wykazano degenerację komórek glejowych w korze przedczołowej oraz osłabienie przewodnictwa synaptycznego [8,125]. Badania histologiczne *post mortem* wskazują na zmniejszoną ekspresję genów BDNF i TrkB w hipokampie i korze przedczołowej u osób z depresją, które popełniły samobójstwo [126,127]. Profil sekrecji BDNF jest zaburzony u pacjentów z depresją, oraz w okresie remisji choroby afektywnej dwubiegunowej. Istnieje silna korelacja pomiędzy niskim stężeniem BDNF w surowicy krwi, a manifestacją choroby afektywnej dwubiegunowej [128,129]. Przewlekły stres oraz glikokortykoidy działają hamująco na proces neurogenезy, głównie poprzez zmniejszenie syntezy BDNF [130]. Chroniczne podawanie leków przeciwdepresyjnych oraz litu, czy sam proces

uczenia wykazują efekt przeciwstawny – promują neurogenezę oraz zwiększają zdolność neuronów do przetrwania na drodze zależnej od TrkB-BDNF [131,132].

Udział sygnalizacji BDNF-TrkB w odpowiedzi antydepresyjnej jest dobrze udokumentowany. Wykazano, że różne klasy antydepresantów zwiększają poziom mRNA BDNF w hipokampie i korze mózgowej poprzez redukcję acetylacji histonów w regionach promotorowych genu *BDNF* [133]. W badaniach na gryzoniach wykazano, że podanie leków przeciwdepresyjnych podnosi poziom ekspresji TrkB i indukuje ścieżki sygnałowe zależne od TrkB w hipokampie i przodomózgowiu w ciągu kilku godzin od ich podania [132,134,135]. Podobne wyniki uzyskano po ostrym podaniu ketaminy, która wykazuje szybki oraz długotrwały efekt przeciwdepresyjny i jest obecnie rozwijana jako nowa terapia w leczeniu depresji lekoopornej [136–138]. Ponadto, bezpośrednia infuzja BDNF do hipokampa zmniejsza zachowania depresyjne u gryzoni. Wykazano, że u gryzoni w modelu wyuczonej bezradności egzogeny BDNF, redukuje opóźnienia ucieczki i ryzyko niepowodzeń po porażeniu prądem oraz istotnie skraca czas bezruchu w teście wymuszonego pływania [139–141]. Co ciekawe, iniekcja BDNF do jądra półleżącego lub okolicy nakrywkowej brzusznej sprzyja efektom depresyjnym, wykazując zależny od regionu mózgu wpływ BDNF na regulację nastroju u szczurów [142]. Wykazano też, że warunkowe wyłączenie genu BDNF w rejonach przodomózgowia zwiększa zachowania depresyjne u samic, ale nie u samców myszy i blokuje działanie leków przeciwdepresyjnych tj. dezypraminy lub ketaminy [136,143,144]. Podobnie, warunkowe wyłączenie genu TrkB w zakręcie zębatym hipokampa lub hamowanie sygnalizacji TrkB, wywołane poprzez nadekspresję TrkB-T1 blokuje działanie leków przeciwdepresyjnych u myszy [145,146]. Co więcej, pacjenci z polimorfizmem Val66Met w genie BDNF są niewrażliwi na leki przeciwdepresyjne oraz leczenie ketaminą [147,148].

Widać zatem, że zaburzenia szlaku sygnałowego BDNF odgrywają istotną rolę w patogenezie zaburzeń depresyjnych, a przywrócenie równowagi BDNF-TrkB jest warunkiem osiągnięcia stanu remisji. Niestety, próby wprowadzenia BDNF jako środka terapeutycznego zakończyły się porażką, gdyż BDNF wykazuje niekorzystne właściwości farmakokinetyczne. BDNF podany obwodowo ulega szybkiej degradacji oraz nie przenika przez barierę krew-mózg [22,25,57,149]. Niemniej jednak, racjonalnym rozwiązaniem, na którym opierałaby się nowa terapia byłoby zwiększenie produkcji endogenego BDNF. W tym celu przetestowano dotychczas różne strategie: (i) podjęto próbę

opracowania cząsteczek indukujących transkrypcję, translację i sekrecję BDNF [150]; (ii) dostarczano do struktur mózgowych (m.in. prążkowiec, mózdzek oraz kory czołowej) gen *BDNF* za pośrednictwem adenowirusa lub innych wektorów wirusowych [151–154]; oraz (iii) dostarczano m.in. do rdzenia kręgowego komórki produkujące BDNF w formie bezpośredniej bądź kapsułkowanej [155–157]. Przedstawione rozwiązania jak dotąd nie wykroczyły poza obszar badań przedklinicznych, jednakże uzyskane wyniki stanowią obiecujący punkt wyjścia do dalszej eksploracji i rozwoju terapii celującej w gospodarkę BDNF. Inną formą wykorzystania BDNF w farmakoterapii są metody oparte na dostarczaniu egzogenego białka, choć wybór drogi podania leku w tym przypadku jest w dalszym ciągu limitowany niemożnością BDNF do przekraczania BBB (ang. *blood-brain barrier*; bariera krew-mózg). Badano także, stosunkowo nieinwazyjne, pozwalające ominąć barierę krew-mózg donosowe podawanie preparatu zawierającego BDNF [158–162]. Pomimo, iż śluzówka nosa jest dobrze ukrwiona i łatwo przepuszczalna dla ksenobiotyków to stosunkowo duża (w porównaniu do związków chemicznych) masa cząsteczkowa BDNF mocno ogranicza jego wchłanianie do organizmu [163]. Próby sprzężenia BDNF z innymi cząsteczkami w celu poprawienia jego parametrów PK i zwiększenia penetracji BBB także nie przyniosły oczekiwanych rezultatów [10,164,165]. Nie mniej ważne są również aspekty ekonomiczne, sam proces produkcji rekombinowanego BDNF na skalę przemysłową o pożądanej czystości farmaceutycznej jest kosztowo nieefektywny, z uwagi na niską wydajność procesów biotechnologicznych [166]. Dodatkowo, jak każda terapia również i ta oparta na BDNF niesie za sobą ryzyko wystąpienia objawów niepożądanych. Do najczęściej odnotowanych w przeprowadzonych badaniach klinicznych należą: zaburzenia snu, agitacja, parestezja, napady epileptyczne oraz biegunka [167,168]. Podsumowując, żadne z powyższych rozwiązań technologicznych nie zostało zarejestrowane jako nowa forma terapii przez właściwe agencje ds. rejestracji leków. Ogromny wysiłek włożony w opracowanie nowoczesnej terapii, która pośrednio bądź bezpośrednio miałaby odwrócić zmniejszenie poziomu BDNF w stanach chorobowych pozostaje nieefektywna, bądź wymaga dalszej eksploracji, rozwiązując kwestie związane z biodostępnością BDNF, bezpieczeństwem oraz kosztami terapii. Z punktu widzenia farmakologicznego, związki małowczątkowe, które wykazywałyby powinowactwo do receptora TrkB i byłyby zdolne indukować jego aktywność i mogłyby naśladować fizjologiczny efekt BDNF. Jak dotąd nie zarejestrowano żadnego leku, który bezpośrednio

oddziaływałyby z tym celem molekularnym. Narastająca potrzeba związana z opracowaniem innowacyjnych, a przy tym skutecznych i bezpiecznych terapii zaburzeń neuropsychiatrycznych, w pełni uzasadnia badania nad rozwojem małowzrostkowych agonistów TrkB jako potencjalnych kandydatów na lek.

1.6. Proces rozwoju nowego leku

Odkrycie i rozwój nowego leku (ang. *drug discovery*) jest procesem kosztownym i rozłożonym w czasie. Szacuje się, że koszty związane z wprowadzeniem nowej terapii na rynek sięgają ponad 100 milionów dolarów i proces ten trwa średnio 12 lat [169]. Historycznie, nowe leki były identyfikowane na drodze badań fenotypowych (ang. *phenotypic screening*). Współczesna farmakologia oferuje podejście, w którym odkrywany lek jest ściśle ukierunkowany na cel molekularny (ang. *target-based screening*). Obydwie strategie, mimo iż komplementarne, to skupiają się na różnych założeniach. W podejściu fenotypowym rozważa się przede wszystkim funkcjonalność–związki są badane w celu znalezienia tych, które zmieniają fenotyp, a stan chorobowy i mechanizm ich działania zostają identyfikowane później. W podejściu opartym na celu molekularnym identyfikuje się gen, lub białko docelowe, które jest zaangażowane w chorobę, a molekuly są badane pod kątem interakcji o wysokim powinowactwie do celu molekularnego [170,171].

Proces *drug discovery* oparty na celu molekularnym korzysta z odkryć w dziedzinie biochemii, biologii strukturalnej, chemii, genomiki i biotechnologii. Pierwszym etapem jest faza eksploracyjna, która obejmuje badania podstawowe mające na celu zrozumienie procesów biochemicznych i patofizjologicznych konkretnego schorzenia, dla którego potrzebny jest lek. Faza badań podstawowych kończy się wskazaniem konkretnego celu molekularnego (genu bądź białka), który ma być modulowany. Kolejno, w toku badań przedklinicznych selekcjonuje się cząsteczki wykazujące wiązanie i interakcje z celem molekularnym. Największe wyzwanie stanowi wybór związku, który specyficznym modulowałby aktywność celu molekularnego w pożądanym kierunku. W tym celu przeprowadza się testy przesiewowe, z wykorzystaniem technologii o możliwie jak największej przepustowości (HTS; ang. *high throughput screening*), co pozwala na szybkie przebadanie dużej liczby cząsteczek w krótkim czasie, umożliwiając identyfikację najbardziej obiecujących związków [171]. Następnie, wytypowane molekuly przechodzą rygorystyczną ścieżkę badań *in silico*, *in vitro* i *in vivo*. Podczas fazy przedklinicznej, która

obejmuje również testy komórkowe i badania na małych zwierzętach, ocenia się bezpieczeństwo i skuteczność kandydatów na lek. Na tym etapie często dokonuje się modyfikacji cząsteczki wiodącej, w celu zajęcia możliwie jak największej przestrzeni patentowej oraz poprawy właściwości fizykochemicznych cząsteczek. Równolegle trwają prace rozwojowe w dziedzinie farmacji, które obejmują formułowanie postaci leku, dawkowania, drogi dostarczania, badania stabilności, farmakokinetyki oraz farmakodynamiki. Jeżeli cząsteczka pomyślnie przejdzie fazę badań przedklinicznych, wówczas można wystąpić z wnioskiem do właściwych organów regulacyjnych o przeprowadzenie badań klinicznych. Po ustaleniu bezpieczeństwa i skuteczności oraz po spełnieniu wymogów regulacyjnych, kandydujące leki mogą kwalifikować się do badań klinicznych obejmujących badania kliniczne fazy od I do IV [172].

Ogólnie szacuje się, że spośród setek tysięcy przebadanych molekuł tylko około 250 wchodzi w fazę przedkliniczną, około dwóch do pięciu wchodzi w fazę kliniczną, a tylko jeden lek uzyskuje zgodę organu regulacyjnego i zostaje wprowadzony do obrotu. Wskaźnik niepowodzeń w przypadku rejestracji nowych leków ukierunkowanych na choroby OUN jest bardzo wysoki w porównaniu z innymi (za wyjątkiem onkologii) obszarami terapeutycznymi. Taki stan rzeczy znajduje odzwierciedlenie w wielu programach badawczych firm farmaceutycznych, których to programy dotyczące schorzeń OUN zostały rozwiązane lub znacznie ograniczone [173,174]. Jest to najbardziej widoczne w przypadku rozwijanych leków, które próbują zahamować lub odwrócić przebieg choroby, co w szczególności dotyczy to chorób neurodegeneracyjnych. W wielu przypadkach leki, które przyniosły widoczne efekty, są terapiami paliatywnymi, które mają niewielki wpływ na znoszenie objawów choroby i nie mają widocznego wpływu na zahamowanie postępów choroby [175].

1.7. Odkrycie małowcząsteczkowych agonistów TrkB jako potencjalnych leków

W roku 2010 dokonano odkrycia, w którym postulowano, że zidentyfikowano cząsteczkę wykazującą interakcję i aktywującą receptor TrkB naśladującą funkcjonalne właściwości BDNF. Poprzez fenotypowe badania przesiewowe *in vitro*, z użyciem linii komórkowej ze stabilną nadekspresją TrkB wyselekcjonowano molekułę, wykazującą działanie cytoprotekcyjne w modelu indukowanej toksyczności z użyciem staurosporyny [176]. 7,8-dihydroksyflawon (7,8-DHF), bo o nim mowa, jest zaliczany do flawonoidów.

Flawonoidy to powszechna klasa związków polifenolowych występujących w roślinach, o potwierdzonych właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych oraz przeciwnowotworowych [177,178]. Z użyciem modeli pierwotnych neuronów hipokampalnych oraz korowych wykazano zdolność 7,8-DHF do indukowania dimeryzacji i fosforylacji TrkB z jednoczesną aktywacją ścieżek sygnałowych związanych z PLC γ 1, Akt i ERK1/2 [176]. W badaniach *in vivo*, 7,8-DHF potwierdził swoje właściwości neuroprotektcyjne i naśladujące BDNF. Udowodniono, że podanie 7,8-DHF myszom pozytywnie wpływa na przeżywalność neuronów hipokampalnych po zastosowaniu kwasu kainowego. Ponadto, na drodze zależnej od aktywacji TrkB, 7,8-DHF zmniejszał objętość zawału w mysim modelu udaru wywołanym przejściową okluzją tętnicy środkowej mózgu [176].

Kolejne badania wskazują na potencjalne zastosowanie 7,8-DHF w praktyce klinicznej i potwierdzają terapeutyczne właściwości związku w kontekście leczenia chorób neuropsychiatrycznych i neurodegeneracyjnych. 7,8-DHF w przeciwieństwie do BDNF wykazuje zadowalającą biodostępność po doustnym podaniu oraz przenika przez barierę krew-mózg [176,179]. Chroniczne podawanie 7,8-DHF sprzyja neurogeniezie w regionie zakrętu zębatego hipokampa u dorosłych myszy, podobnie jak po zastosowaniu typowych antydepresantów [180–182]. Na poziomie behawioralnym, 7,8-DHF istotnie redukuje czas bezruchu w testach wymuszonego pływania i wiszenia za ogon, co wskazuje na potencjalny efekt antydepresyjny [182,183]. Późniejsze badania potwierdzają właściwości przeciwdepresyjne związku. Wykazano m.in., że 7,8-DHF odwraca zachowania depresyjne u gryzoni, które oceniano przy użyciu testu preferencji sacharozy i testu karmienia z supresją nowości w mysim modelu chronicznego nieprzewidywalnego stresu. Na poziomie molekularnym wykazano wzrost ekspresji białek synaptycznych (synapsyny i PSD95) oraz zwiększony poziom fosforylacji TrkB w korze frontalnej po podaniu 7,8-DHF (Zhang i in., 2016). Aktywność związku testowano także w modelu wyuczonej bezradności oraz zachowań depresyjnych wywołanych lipopolisacharydami, w których również wykazano efekt przeciwdepresyjny [185–187].

W modelach chorób neurodegeneracyjnych, chroniczne podawanie 7,8-DHF wpływa na poprawę funkcji psychomotorycznych u zwierząt. 7,8-DHF odwracał deficyty poznawcze związane z procesami uczenia się i pamięci w modelu choroby Alzheimera. Efekt ten wynikał z zaangażowania związku w procesy związane z odbudową kolców dendrytycznych i synaptogenezę, co pozytywnie wpływało na długotrwałe wzmocnienie

synaptyczne w regionie CA1 hipokampa [188,189]. Wykazano również, że długotrwałe podawanie 7,8-DHF gryzoniom z modelowaną chorobą Parkinsona i Huntingtona koreluje z poprawą funkcji motorycznych w teście Rota Rod oraz funkcji poznawczych mierzonych testem rozpoznawania nowego obiektu [190–193].

Narastająca ilość dowodów naukowych wskazujących na terapeutyczne właściwości 7,8-DHF doprowadziła do rozwoju kolejnych małowzrostkowych agonistów TrkB. Należą do nich drobnocząsteczkowe związki LM22-A4, LM22-B10, HIOC, N-acetylo serotonina (NAS), DMAQ-B1, OSSK-495385 oraz małowzrostkowy peptydomimetyk GSB-106 [194–198]. Wyniki doświadczeń wskazują na zdolność molekuł do pozytywnej modulacji receptora TrkB i wywierania efektów funkcjonalnych. Jednakże, żaden ze wspomnianych tu agonistów TrkB nie stanowi przedmiotu badań klinicznych i nie został jak dotąd zarejestrowany jako lek.

Dobrze udokumentowana funkcja BDNF jaką pełni w OUN oraz potwierdzona zależność pomiędzy zaburzeniami w sygnalizacji BDNF-TrkB a patofizjologią chorób neuropsychiatrycznych sprawia, iż receptor TrkB stanowi atrakcyjny cel molekularny do poszukiwania nowych terapii. Jak pokazują wyniki badań przedklinicznych, 7,8-DHF jest zdolny do aktywacji receptora TrkB oraz wywołania efektu farmakologicznego, szczególnie w odniesieniu do chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Pomimo iż wspomniane powyżej badania świadczą o wysokim potencjale terapeutycznym agonistów TrkB, istnieje również literatura kwestionująca działanie tych ligandów w odniesieniu do receptora TrkB [199,200]. W badaniach z wykorzystaniem pierwotnych hodowli neuronalnych oraz komercyjnie dostępnych systemów komórkowych *in vitro* stworzonych do badania ligandów TrkB (CellSensor, PathHunter), badacze zaobserwowali brak efektów małowzrostkowych agonistów TrkB na aktywację receptora oraz brak oczekiwanych efektów funkcjonalnych w postaci aktywacji wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych zależnych od TrkB [199,200].

W niniejszej rozprawie podjęto próbę identyfikacji nowych, małowzrostkowych agonistów receptora TrkB – kandydatów na lek – mogących stanowić narzędzie interwencji farmakologicznej w chorach OUN, a w szczególności depresji. Dodatkowo, z uwagi na podniesioną w piśmiennictwie wątpliwość co do aktywności dostępnych

agonistów TrkB, w pracy dokonano kompleksowej charakterystyki wybranych związków w odniesieniu do aktywności funkcjonalnej, interakcji oraz modulacji receptora TrkB.

2. CEL PRACY

W związku z realizacją niniejszej pracy doktorskiej w ramach programu *Doktorat Wdrożeniowy*, przeprowadzone prace doświadczalne miały charakter badawczo-rozwojowy, kładąc duży nacisk na możliwość komercjalizacji otrzymanych rezultatów.

Nadrzędnym celem rozprawy była próba identyfikacji innowacyjnych, małowzrostkowych agonistów TrkB, o potwierdzonej aktywności *in vitro* i *in vivo*, gotowych do dalszego rozwoju przedklinicznego i mających potencjalne zastosowanie w terapii chorób ośrodkowego układu nerwowego.

W niniejszej pracy szczególną uwagę zwrócono również na farmakologię opisanych w piśmiennictwie agonistów TrkB weryfikując doniesienia dotyczące aktywności związków małowzrostkowych jako agonistów TrkB. W związku z czym, poprzez opracowanie dedykowanej platformy badawczej, realizowano następujące zadania badawczo-rozwojowe, które podzielono na trzy etapy:

- i. Badania przesiewowe biblioteki związków w celu identyfikacji innowacyjnych związków oddziałujących z zewnątrzkomórkową domeną TrkB oraz aktywujących receptor TrkB w warunkach *in vitro*
- ii. Kompleksowa charakterystyka wybranych, małowzrostkowych związków referencyjnych mająca na celu weryfikację doniesień literaturowych dotyczących ich właściwości naśladujących działanie BDNF
- iii. Zaawansowane badania farmakologiczne nad 7,8-dihydroksyflawonem mające na celu próbę ustalenia mechanizmu działania tego związku

3. MATERIAŁY I METODY

Tabela 1. Skład buforów i roztworów stosowanych w doświadczeniach i metodach.

BUFORY PODSTAWOWE	
Bufor PBS (pH=7,4)	1,37 M NaCl
	27 mM KCl
	43 mM Na ₂ HPO ₄
	14 mM KH ₂ PO ₄
TBS (1x) (Tris– buffered saline)	20 mM Tris-HCl
	500 mM NaCl
TBS-T	20 mM Tris-HCl
	500 mM NaCl
	0,1 Tween20
MIKROSKALOWA TERMOFOREZA KAPILARNA	
Bufor MST	50 mM Tris-HCl
	50 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	0,1 % Tween20
ELEKTROFOREZA NATYWNA	
Bufor Laemmli'ego (2x) niedenaturujący	0,6 M Tris
	20% glicerol
	0,01% błękit bromofenolowy, pH = 6,8
Bufor do elektroforezy (nieredukujący)	192 mM glicyna
	25 mM Tris
BUFOR DO LIZY KOMÓREK do przygotowania próbek białkowych	
Bufor N-PER	N-PER™ Neuronal Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific)
	Mieszanina inhibitorów proteaz (1x Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail, Thermo Fisher Scientific)
	Mieszanina inhibitorów fosfataz (1X PhosSTOP™, Roche)
	5 mM EDTA
BUFOR DO HOMOGENIZACJI TKANEK do przygotowania próbek białkowych	
Bufor RIPA	RIPA buffer (Sigma)
	Mieszanina inhibitorów proteaz (1x Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail, Thermo Fisher Scientific)
	Mieszanina inhibitorów fosfataz (1X PhosSTOP™, Roche)
	5 mM EDTA
ROZTWORY UŻYWANE W METODZIE SDS-PAGE I WESTERN BLOT	
Bufor do elektroforezy	25 mM Tris base
	250 mM glicyna
	0,1 % SDS
Bufor Laemmli'iego (4x) denaturujący	250 mM Tris base

	8 % SDS
	40 % glicerol
	20 % β -merkaptanoetanol
	0,01% błękit bromofenolowy, pH = 6,8
Bufor do elektrotransferu	40 mM Tris base
	40 mM glicyna
	20% metanol

3.1. Cząsteczki wpływające na aktywność receptora TrkB

Do badań wykorzystano komercyjnie dostępną bibliotekę małowcząsteczkowych związków chemicznych, którą pozyskano z ENAMINE. Bibliotekę związków uzupełniono o związki chemiczne zsyntetyzowane przez Laboratorium Chemii Medycznej Celon Pharma S.A.

Ponadto, do badań wykorzystano następujące cząsteczki referencyjne: BDNF (Sigma), DMAQ-B1, LM22A-4, LM22B-10, HIOC (Torcis), 7,8-dihydroksyflawon, NSI-189 (Fluorochem), OSSK-495385 (Mcule), NAS (TCI). Kolejne z nich: 7,8,3'-trihydroksyflawon (7,8,3'-THF), 4'-dimetyloamino-7,8-DHF (4'-DMA-7,8-DHF), GSB-106, izokumaryna, oraz metabolity 7,8-DHF [7-hydroksy-8-metoksyflawon (7H8M-flawon), 8-hydroksy-7-metoksyflawon (8H7M-flawon) zostały zsyntetyzowane przez departament Chemii Medycznej Celon Pharma. S.A. Struktury chemiczne związków referencyjnych zawarte są w Tabeli Z1 stanowiąc załącznik do niniejszej pracy.

Wszystkie związki chemiczne zostały rozpuszczone bądź zawieszono w DMSO (Sigma), tak aby stężenie końcowe każdego związku wynosiło 10 mM. BDNF rozpuszczono w PBS (pH 7,4) do stężenia 100 ng/mL.

3.2. Badania przesiewowe z użyciem metody mikroskalowej termoforezy kapilarnej

3.2.1. Przygotowanie białka exTrkB do badań

Do badań użyto zewnątrzkomórkowej domeny receptora TrkB (exTrkB) zawierające reszty aminokwasowe 1-430. Białko exTrkB zostało wyprodukowane przez PRO Biostructures i zostało dostarczone w formie stężonych preparatów białkowych (1 mg/mL) zawieszonych w buforze PBS. Przed przystąpieniem do badań z wykorzystaniem metody mikroskalowej termoforezy kapilarnej (MST; ang. *microscale thermophoresis*) białko

exTrkB zostało wyznakowane fluorescencyjnie w miejscu reszt lizynowych z użyciem zestawu Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation (NanoTemper Technologies) zgodnie z instrukcją producenta. Efektywność znakowania białka była każdorazowo sprawdzana spektrofotometrycznie z użyciem aparatu NanoPhotometer® NP80 (Impel) według zaleceń producenta. Wyznakowane białko zostało podzielone na porcje, które przechowywano w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ w celu uniknięcia degradacji białka poprzez powtarzające się cykle zamrażania-rozmrażania. Przed przystąpieniem do eksperymentów MST wyznakowane białko exTrkB zostało rozmrożone na lodzie i rozcieńczone do pożądanego stężenia w buforze MST. Skład buforu MST przedstawia Tabela 1.

3.2.2. Procedura mikroskalowej termoforezy kapilarnej

Do wyznaczenia amplitudy odpowiedzi MST (eksperymenty w układzie *single-point* MST) każdy z 987 badanych związków rozcieńczono w buforze MST do stężenia końcowego 1 mM. Następnie zmieszano 10 uL roztworu związku badanego z 10 uL roztworu wyznakowanego białka exTrkB (40 nM), otrzymaną mieszaninę zwirowano (10,000x g, 4 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) w celu pozbycia się potencjalnych agregatów białka oraz związku. Po przeprowadzonym wirowaniu próbki inkubowano 5 min w $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i załadowano do kapilar (Monolith NT.115 Capillaries, NanoTemper Technologies GmbH) po czym umieszczono w aparacie do termoforezy (Monolith, NanoTemper Technologies GmbH). Eksperyment MST wykonano korzystając z zaprogramowanych ustawień o następujących parametrach: 20% mocy ekscytacji światłem LED (*nano-blue*), średnia moc MST, detekcja fluorescencji po 30 s. Amplituda odpowiedzi MST została wyznaczona z użyciem oprogramowania MO. Control Software (NanoTemper Technologies GmbH) poprzez określenie różnic intensywności fluorescencji exTrkB w formie związanej (exTrkB-związek) i niezwiązanej (exTrkB-DMSO). Każdy eksperyment MST uwzględniał analizę próbki referencyjnej, którą stanowiło białko exTrkB i DMSO (w stężeniach ekwiwalentnych jak przypadku badanych związków).

Do wyznaczenia parametru stałej dysocjacji (K_d), przygotowano szereg 16-tu rozcieńczeń badanych związków. Zakres stężeń został dobrany indywidualnie dla każdej z badanych molekuł. Na tym etapie dokonywano analizy turbidometrycznej (ocena wizualna) celem określenia rozpuszczalności związku. Związki chemiczne, które wykazywały

zmętnienia w przygotowanych próbkach świadczące o słabej rozpuszczalności związku zostały usunięte z analiz. Próbki z rozcieńczeniami związku zmieszano z wyznakowanym exTrkB i procesowano analogicznie jak opisano powyżej, stosując identyczne parametry termoforezy. Stałą dysocjacji K_d wyznaczono z użyciem oprogramowania MO. Binding Affinity Software (NanoTemper Technologies GmbH).

3.3. Elektroforeza natywna

Eksperyment wykonano z wykorzystaniem niewyznakowanego białka exTrkB (patrz punkt 3.2.1.). Związki badane, BDNF oraz exTrkB rozcieńczono w buforze PBS do stężenia 2,5 μ M. Z przygotowanych rozcieńczeń badanych związków oraz BDNF pobrano po 15 μ L i zmieszano z taką samą objętością exTrkB. Otrzymaną próbkę inkubowano przez 10 min w 25 °C, po czym dodano odpowiednią ilość niedenaturującego buforu Laemli'ego (Tabela 1). Otrzymane próbki nałożono na gotowy, dwufazowy żel poliakrylamidowy typu Stain Free (4% żel zagęszczający, 10% żel rozdzielający; Mini-PROTEAN[®] TGX Stain-Free[™] Protein Gels, BioRad). Elektroforezę przeprowadzono w aparacie BioRad TetraCell z wykorzystaniem buforu do elektroforezy natywnej (Tabela 1), przy stałym napięciu 90V dla żelu zagęszczającego oraz 130 V dla żelu rozdzielającego. Na żel nałożono taką samą ilość próbek w każdej ścieżce. Po przeprowadzonym rozdziale elektroforetycznym, wykonano zdjęcie żelu z użyciem kamery ChemiDoc MP Imaging System (BioRad) w celu wizualizacji prążków.

3.4. Hodowle linii komórkowych

Tabela 2. Materiały i odczynniki stosowane przy hodowlach linii komórkowych.

POŻYWKI HODOWLANE I ODCZYNNIKI	
Pożywka hodowlana DMEM	DMEM High Glucose (L0104, Biowest)
	10% bydlęca surowica płodowa (FBS, S1400, Biowest)
	Mieszanina penicyliny i streptomycyny (L0022-100, Biowest)
	300 µg/mL G418 (ThermoFisher Scientific)
Pożywka hodowlana MEM/HAM'S F12	MEM with Earle Salts, L-glutamine (L0415, Biowest)
	HAM'S F12, L-glutamine (L0135, Biowest)
	15% bydlęca surowica płodowa (FBS, 10270106, ThermoFisher Scientific)
	Mieszanina antybiotyków (L0010, Biowest)
	Mieszanina aminokwasów (X0557, Biowest)
Odczynniki stosowane do rutynowej pracy z hodowlami komórkowymi	0,25 % roztwór trypsyny z EDTA (Biowest)
	0,05% roztwór trypsyny z EDTA (Biowest)
	DMSO do mrożenia komórek (D2650, Sigma)
	0,4% błękit trypanu (Sigma- Aldrich)
	kwasy retinowe (RA, Sigma- Aldrich)
NACZYNNIA HODOWLANE	
Butelka hodowlana	Butelka o powierzchni wzrostowej 25 cm ² lub 75 cm ² z wentylowanym korkiem (353108, 353136, Corning)
Płytki wielodołkowe	96-dołkowa płytka powlekana poli-D-lizyną (356692, BioCoat™, Corning), 6-dołkowa płytka hodowlana (353046, Corning)

3.4.1. Linie komórkowe użyte w doświadczeniach oraz warunki ich hodowli

Linie komórkową SN56 (hybrydoma mysich komórek neuronalnych izolowanych z przegrody przezroczystej oraz komórek mysiej neuroblastomy N18TG2) ze stabilną nadprodukcją ludzkiego białka TrkB (klon T48) pozyskano ze zbiorów Uniwersytetu Emory [176] i hodowano w pełnej pożywce DMEM (Tabela 2). Hodowlę linii SH-SY5Y (komórki ludzkiej neuroblastomy, ECACC) prowadzono w medium MEM/HAM'S F12 (Tabela 2). Linie komórkowe hodowano w plastikowych butelkach (Tabela 2), w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37 °C w inkubatorze do hodowli kultur komórkowych *in vitro*.

Po osiągnięciu 80% konfluencji, komórki pasażowano w celu utrzymania ciągłości hodowli linii komórkowych. W tym celu, powierzchnie butelki przepłukano roztworem PBS po czym dodano 3 mL trypsyny (Tabela 2) i umieszczono w inkubatorze na 3 minuty. Po odklejeniu się komórek od dna naczynia hodowlanego w wyniku nadtrawienia macierzy zewnątrzkomórkowej, do butelki dodano 6 mL pełnej pożywki w celu dezaktywacji trypsyny. Powstałą zawiesinę komórek przeniesiono do probówki i zwirowano (250x g; 5 min, 25 °C). Otrzymany osad komórkowy zawieszono w 3 mL medium i pobrano 20 µL zawiesiny celem określenia liczby komórek z użyciem błękitu trypanu (Tabela 2) i automatycznego licznika komórek Countess 3 (ThermoFisher Scientific). Następnie, komórki umieszczono w świeżym medium hodowlanym w odpowiedniej gęstości (SN56 T48 2×10^3 komórek/cm²; SH-SY5Y 1×10^4 komórek/cm²). Linie komórkowe pasażowano średnio co 3-4 dni, nie przekraczając 20-go pasażu.

W celu długotrwałego przechowywania linii komórkowych, po przeprowadzonej trypsynizacji i wirowaniu (patrz wyżej) część komórek zawieszano w pożywce hodowlanej z dodatkiem 20 % FBS i 10 % DMSO (Tabela 2). Komórki umieszczono w pudełku mrozeniowym (Bioscison) i zamrażano w -80 °C przez 24 h, a następnie przechowywano w ciekłym azocie.

W celu rozmrożenia, probówki z określoną linią komórkową umieszczano w łaźni wodnej (37 °C), przenoszono do dedykowanej pożywki hodowlanej i wirowano (250x g; 5 min, 25 °C), aby móc pozbyć się pozostałości DMSO. Osad komórkowy delikatnie przenoszono do pełnej pożywki hodowlanej.

3.4.2. Różnicowanie komórek linii SH-SY5Y z użyciem kwasu retinowego.

Komórki linii SH-SY5Y wysiano na butelkę hodowlaną w pełnej pożywce MEM/HAM'S F12 w gęstości 1×10^4 komórek/cm². Kolejnego dnia medium hodowlane wymieniono na świeże z dodatkiem kwasu retinowego w docelowym stężeniu 10 µM (RA; ang. *retinoic acid*). Komórki umieszczono w inkubatorze i hodowano w standardowych warunkach przez kolejne 7 dni. Po tym czasie oceniano stopień zróżnicowania analizując morfologię komórek z użyciem mikroskopu odwróconego w powiększeniu 10x (Eclipse TS100, Nikon). W dalszej kolejności, komórki trypsynizowano (3 mL 0,05% trypsyna z EDTA, 3 min, 37 °C), a następnie neutralizowano pełną pożywką MEM/HAM'S F12. Otrzymaną zawiesinę komórek przeniesiono do probówki,

zwirowano (250x g; 5 min, 25 °C) i zawieszono w 1-3 mL pożywki. Gęstość komórek określono z użyciem automatycznego licznika komórek. W zależności od docelowego eksperymentu i przeprowadzanych analiz, zróżnicowane komórki (RA_SH-SY5Y) w odpowiedniej gęstości wysiewano na wielostudzienkowe płytki hodowlane w pełnej pożywce z dodatkiem RA o końcowym stężeniu 10 µM.

3.5. Badanie aktywności receptora TrkB metodą ELFI

Komórki linii SN56 T48 wysiewano w pełnej pożywce na 96-dołkową płytkę hodowlaną (Tabela 2) w gęstości 8×10^3 komórek/dołek i umieszczano w inkubatorze na całą noc. Nazajutrz, komórki głodzono przez 5 h poprzez wymianę pożywki pełnej na pożywkę pozbawioną FBS. Następnie, do komórek dodawano badane cząsteczki rozcieńczone w pożywce DMEM (bez FBS). W eksperymentach badających aktywność ortosteryczną związków, do stymulacji używano następujących stężeń końcowych: BDNF– 10; 5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3, 0,15; 0,075; 0,0375, 0,015 [nM], dla związków małocząsteczkowych– 100, 50, 25, 12,5; 1,25, 0,125 [µM]. Eksperymenty w układzie allosterycznej modulacji polegały na jednoczesnym traktowaniu komórek BDNF (stężenia końcowe 5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3; 0,15 [nM]) ze związkami małocząsteczkowymi (stężenia końcowe 30, 10, 3 [µM]). W komórkach kontrolnych dodano DMSO. Czas inkubacji komórek ze związkami wynosił 15 minut.

Do badania aktywności receptora TrkB zastosowano metodę ELFI (ang. *enzyme-linked fixed cell immunoassay*, enzymatyczny test immunologiczny na utrwalonych komórkach), wprowadzając modyfikacje do procedury opisanej przez Boltayev et al. 2017. Po przeprowadzonej stymulacji komórek usunięto usuwano pożywkę po czym dodawano 10% roztwór buforowanej formaliny (Kolchem) i inkubowano przez 20 min (25 °C) celem utrwalenia komórek. Następnie, po usunięciu roztworu buforowanej formaliny komórki przepłukiwano trzykrotnie buforem TBS, a potem permabilizowano błony komórkowe dodając TBS-T (Tabela 1) i inkubując przez 15 min w 25 °C. Po serii płukań do dołków dodawano 1% roztwór nadtlenku wodoru w buforze TBS celem zahamowania aktywności endogennych peroksydaz. Po upływie 20 minut blokowano epitopy, inkubując utrwalone komórki w roztworze 5% BSA (Biowest) w TBS-T przez 2 godziny. Po tym czasie usuwano roztwór do blokowania i rozpoczęto inkubację (4 °C, przez noc) z przeciwciałem pierwszorzędowym anti-pTrkB (Tabela 3) rozcieńczonym w 5% BSA

w TBS-T w stężeniu 1:500. Kolejnego dnia, komórki trzykrotnie płukano w TBS-T przez 15 min w temperaturze pokojowej, po czym inkubowano przez z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (HRP; ang. *horseradish peroxidase*) rozcieńczonym 1:2000 w 5% BSA w TBS-T. Po upływie dwóch godzin i trzykrotnym odpłukaniu pozostałości przeciwciała do dołków dodawano substrat dla HRP (ImmunoCruz™, SantaCruz Biotechnology) i inkubowano przez 1 min w ciemności. Intensywność luminescencji rejestrowano z użyciem czytnika płytkowego Victor (PerkinElmer). Do określenia specyficzności przeciwciała drugorzędowego (NSB; ang. *non specific binding*) część komórek inkubowano w 5% BSA w TBS-T zamiast z przeciwciałem pierwszorzędowym. Po zmierzeniu luminescencji, zawartość dołków usunięto i przepłukano dwukrotnie wodą destylowaną. Następnie, w celu normalizacji poziomu luminescencji względem liczby komórek wybarwiono jądra komórkowe z użyciem odczynnika Janus Green II (Abcam), zgodnie z procedurą producenta. Ilość komórek określono poprzez pomiar absorbancji, gdyż zabarwienie roztworu po elucji Janus Green II jest wprost proporcjonalny do liczby wybarwionych jąder komórkowych. Absorbancje zmierzono w płytkowym spektrofotometrze Multiscan™ (ThermoFisher Scientific) przy długości fali 595 nM.

3.6. Analiza ścieżek sygnałowych

3.6.1. Przygotowanie próbek białkowych oraz oznaczanie stężenia białka metodą BCA

Komórki linii SN56 T48 oraz zróżnicowanej SH-SY5Y (patrz podrozdział 3.4.2) wysiano na 6-dołkowe naczynia hodowlane w pełnej pożywce hodowlanej w gęstości 5×10^4 (SN56 T48) oraz 1×10^6 (RA_SH-SY5Y). Następnego dnia, z dołków naczynia hodowlanego usunięto medium i dodano pożywkę bez FBS. Po 5 godzinach głodzenia komórki traktowano badanymi molekułami przez 15 minut. Stężenia końcowe związków wynosiły odpowiednio 1, 10, 100 [μ M] dla DMAQ-B1, 7,8-DHF, CPL503052, CPL503071 i CPL503113 oraz 1, 10, 100 [ng/mL] dla BDNF. Pozostałe związki małowcząsteczkowe badano w stężeniu 100 μ M. Inhibitor domeny kinazowej TrkB - K252a (Sigma Aldrich) zastosowano na 15 minut przed traktowaniem związkami/BDNF (w ich najwyższym

stężeniu, odpowiednio 100 μM i 100 ng/mL) w końcowym stężeniu 1 μM . Komórki kontrolne traktowano DMSO (w stężeniu 1%).

W celu uzyskania preparatów białkowych komórki lizowano w 100 μL buforu N-PER (Tabela 1) przez 15 minut na lodzie. Otrzymane lizaty odwirowano (8000x g; 10 min, 25 $^{\circ}\text{C}$) w celu usunięcia pozostałości komórek. Klarowny nadsącz przenoszono do świeżych probówek i zamrożono w -80 $^{\circ}\text{C}$ zanim przystąpiono do dalszych etapów. Procedurę przygotowania próbek białkowych z tkanek mózgowych opisano w podrozdziale 3.8.3.

Do oznaczenia stężenia białka w próbkach wykorzystano komercyjny zestaw BCA Protein Assay Kit (Pierce). Procedurę wykonano na płytkach 96-dołkowych. W pierwszej kolejności przygotowano serię rozcieńczeń wodnego roztworu BSA (krzywa wzorcowa) o stężeniach 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 2000 mg/mL . Następnie, zgodnie z zaleceniami producenta przygotowano roztwór roboczy BCA mieszając ze sobą odczynnik A i B w stosunku 1:50. Kolejno, do badanych prób (rozcieńczonych uprzednio 10x) oraz krzywej wzorcowej dodano przygotowany roztwór BCA (w stosunku 1:8). Płytkę umieszczono w wytrząsarce orbitalnej, inkubowano przez 30 min w 37 $^{\circ}\text{C}$ po czym zmierzono absorbancję przy długości fali 650 nm z użyciem czytnika płytkowego (MultiscanTM, ThermoFisher Scientific). Następnie, z próbek pobrano taką samą ilość białka, wymieszano z denaturującym buforem Laemmli'ego i podgrzewano przez 5 min w 95 $^{\circ}\text{C}$. Zdenaturowane próbki przechowywano w -20 $^{\circ}\text{C}$ do dalszych analiz.

3.6.2. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

W zależności od ilości badanych próbek rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzono w aparatach BioRad TetraCell bądź OmniPage Mini Wide Cleaver Scientific. Zdenaturowane próbki białkowe oraz standard wielkości białek (TriColor Protein Ladder 10–180 kDa, Biotechrabbit) naniesiono na nieciągły żel poliakrylamidowy (4% żel zagęszczający, 10% żel rozdzielający;) typu Stain-Free. Do przygotowania żelu użyto komercyjnego zestawu TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Solutions (BioRad). Elektroforezę prowadzono w buforze do elektroforezy SDS-PAGE (Tabela 1) przy napięciu 90 V dla żelu zagęszczającego oraz 130 V dla żelu rozdzielającego. Po zakończonym rozdziale, aktywowano żel promieniowaniem UV przy użyciu kamery ChemiDoc MP

Imaging System (BioRad) w celu wizualizacji całkowitego białka w żelu i kontroli nałożenia próbek.

3.6.3. Western blotting

Rozdzielone białka w żelu poliakrylamidowym przeniesiono na membranę nitrocelulozową o wielkości porów $0,45 \mu\text{M}$ (Amersham™, GE Healthcare) z użyciem mokrego elektrotransferu. W zależności od rozmiaru użytego żelu, transfer przeprowadzono w aparacie BioRad TetraCell bądź Biotrans (Kucharczyk) w buforze Tris-glicyna-metanol (Tabela 1) przy stałym napięciu prądu 100 V przez 1 godzinę. Po zakończonym transferze aktywowano membranę (promieniowaniem UV) przy użyciu kamery ChemiDoc MP Imaging System, w celu wizualizacji całkowitego białka na membranie i kontroli efektywności przeprowadzonego elektrotransferu. Następnie, membrany przepłukano w TBS-T i blokowano wolne miejsca na membranie mogące niespecyficzenie wiązać białka w roztworze 5% BSA przynajmniej przez godzinę w temperaturze pokojowej. Membrany inkubowano (przez całą noc w $4 \text{ }^\circ\text{C}$) z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym (Tabela 3), które rozcieńczono w roztworze 5% BSA w TBS-T, łagodnie mieszając na kołysce laboratoryjnej. Kolejnego dnia membrany trzykrotnie przepłukano w TBS-T (15 min), a następnie inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z HRP w roztworze 5% BSA w TBS-T przez co najmniej dwie godziny w temperaturze pokojowej, łagodnie mieszając. Po tym czasie, membrany przepłukano w TBS-T (15 min). Analizowane białka rozpoznane przez specyficzne przeciwciała zostały zwizualizowane metodą chemiluminescencji z użyciem gotowego zestawu Clarity/Clarity Max ECL Western Blotting Substrates (BioRad) oraz kamery ChemiDoc MP Imaging System (BioRad). Pomiarzy densytometryczne wykonano z użyciem oprogramowania Image Lab, a uzyskane wyniki normalizowano względem białka całkowitego nałożonego na żel, co zarejestrowano podczas aktywacji membrany po elektrotransferze. W celu wykrycia kolejnych białek na membranach, po przeprowadzonej detekcji, membrany inkubowano w buforze do oczyszczania (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, ThermoFisher Scientific) przez 60 min w $37 \text{ }^\circ\text{C}$ łagodnie mieszając. Następnie, całą procedurę Western blot rozpoczęto od nowa, jak opisano to powyżej (blokowanie, inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym i drugorzędowym).

Tabela 3. Lista przeciwciał stosowanych w doświadczeniach Western blot.

Antygen	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent	Numer katalogowy	Forma
Fosfo- TrkB (Tyr706)	Królik	1:1000	Cell Signaling Technology	4621	monoklonalne
TrkB	Królik	1:1000	Cell Signaling Technology	4603	monoklonalne
Fosfo-PLC γ 1 (Tyr783)	Królik	1:1000	Cell Signaling Technology	2821	poliklonalne
PLC γ 1	Królik	1:1000	Cell Signaling Technology	2822	poliklonalne
Fosfo-Akt1 (Ser473)	Królik	1:1000	Cell Signaling Technology	4060S	monoklonalne
Akt1	Królik	1:3000	Cell Signaling Technology	9272	poliklonalne
Fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Królik	1:3000	Cell Signaling Technology	4370	monoklonalne
ERK1/2	Królik	1:4000	Cell Signaling Technology	9102	poliklonalne
Anty- królicze IgG sprzężone z HRP	Koza	1:5000	Cell Signaling Technology	7074	poliklonalne

3.7. Badanie właściwości cytoprotekcyjnych związków

Eksperyment zaprojektowano i wykonano w oparciu o metodykę opisaną przez Presgraves i wsp., 2014 z pewnymi modyfikacjami [201]. Właściwości cytoprotekcyjne związków badano poprzez ocenę żywotności komórek używając do tego celu komercyjny odczynnik RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega), który emituje luminescencję w wyniku redukcji substratu przez aktywne metabolicznie komórki.

Zróznicowane kwasem retinowym komórki linii SH-SY5Y (patrz 3.4.2) wysiano w pełnej pożywce hodowlanej z dodatkiem 10 μ M RA na płytkę 96-dołkowa pokrytą PDL (Tabela 2) w gęstości 1×10^4 komórek/dołek. Kolejnego dnia usunięto stare medium, które zastąpiono pożywką o zredukowanej zawartości FBS do 1% i zawierającą odczynnik RealTime-Glo. Po godzinnej inkubacji w 37°C zmierzono poziom luminescencji w czytniku płytek (VICTOR Light 1420-060, Perkin Elmer) zachowując przy tym aseptyczne warunki. Następnie, do komórek dodawano rozcieńczenia badanych molekuł w formie dwukrotnie stężonych roztworów rozpuszczonych w pożywce z 1% FBS. Stężenia końcowe, którymi traktowano komórki wynosiły: 0,3; 1; 3 [μ M] dla związków maciejasteczkowych oraz 0,3; 1; 3 ng/mL dla BDNF. Komórki umieszczono w inkubatorze i pozostawiono na 72 h. Po tym czasie usunięto stare medium, dodano świeża porcję

pożywki z 1% FBS zmieszana z odczynnikiem RealTime-Glo, inkubowano przez godzinę w 37°C i zmierzono poziom luminescencji. W dalszej kolejności, do komórek dodano rozcieńczenia badanych molekuł w formie 4x stężonych roztworów zawieszonych w pożywce z 1% FBS (stężenia końcowe jak wyżej), oraz MPP⁺ o końcowym stężeniu 0,5 mM w celu zaindukowania śmierci komórek. Komórki kontrolne traktowano DMSO. Płytki z komórkami umieszczono w inkubatorze i pozostawiono na 72 h. Po trzech dniach usunięto starą pożywkę i ponownie dodano świeże medium (1% FBS) wraz z odczynnikiem RealTime-Glo i po upływie godziny dokonano oceny żywotności komórek poprzez pomiar luminescencji.

3.8. Badania *in vivo*

3.8.1. Przebieg eksperymentu oraz pozyskanie materiału do badań

Tabela 4. Podział zwierząt na grupy eksperymentalne.

Grupa	Substancja	Podanie	Dawka	Formulacja	Punkty czasowe
Grupa I	7,8-DHF	Dożylnie	1 mg/kg	5% DMSO, 1.5% metyloceluloza w wodzie	5 min 10 min 30 min 1 h 2 h
Grupa II	7,8-DHF	Doustne	50 mg/kg	30% PEG 400 w 0,9% NaCl	10 min 30 min 1 h 2 h 4 h
Grupa III	Nośnik	Doustne	-	30% PEG 400 w 0,9% NaCl	10 min 30 min 1 h 2 h 4 h

Podanie substancji, uśmiercenie zwierząt oraz pobranie tkanek zostało wykonane przez personel Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Eksperyment przeprowadzono zgodnie z wytycznymi i za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie (uchwała nr 10/2019) z dnia 26.02.2019. Do badań wykorzystano samce myszy szczepu wsobnego BALB/c o masie 20-25 g w wieku 8-10 tygodni. Zwierzęta pochodziły z hodowli Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Myszy

przechowywano w klatkach z nieograniczonym dostępem do wody i paszy, z zachowaniem 12-godzinnej cyklu dzień/noc. Wszystkie procedury wykonywane na zwierzętach odbywały się za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie.

Na 12 godzin przed przystąpieniem do procedury podawania związku zwierzętom usunięto dostęp do pokarmu i wody. Zwierzęta podzielono na grupy eksperymentalne zgodnie z Tabelą 4, liczące po 4 osobniki na punkt czasowy. Mysiom podawano związek 7,8-DHF na drodze iniekcji do żyły ogonowej (podanie *i.v.*) bądź dożołądkowo (podanie *p.o.*). Na potrzebę przeprowadzenia badań farmakodynamicznych zwierzętom kontrolnym został podany nośnik skomponowany dla doustnego podania 7,8-DHF (30% PEG 400 w 0,9% NaCl) z uwagi na bogatszy skład formulacyjny w porównaniu do składu nośnika dla podania dożylnego. Następnie, w odpowiednim punkcie czasowym po podaniu (patrz Tabela 4) zwierzęta usypiano za pomocą izofluranu z wykorzystaniem aparatu anestezjologicznego i uśmiercono poprzez całkowite skrwawienie z serca. W tym czasie pobrano próbki krwi do próbek z antykoagulantem (K_2EDTA), które odwirowano (15 min, 3000x g) w temperaturze pokojowej celem separacji osocza. Otrzymane próbki osocza wykorzystano do pomiaru stężenia związków i przechowywano w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nim przystąpiono do analiz. Z uśmierconych zwierząt wyizolowano również mózgi, które podzielono na dwie półkule. Lewą półkulę zważono i zamrożono w ciekłym azocie. Z prawej półkuli z użyciem binokularu wypreparowano hipokamp oraz korę czołową a następnie szybko zamrożono. Procedurę izolowania struktur mózgowych przeprowadzono na lodzie. Lewą półkulę mózgu przeznaczono do analizy farmakokinetycznej, zaś wyizolowane struktury z prawej półkuli posłużyły do oceny efektu farmakodynamicznego związku wykorzystując metodą Western blot.

3.8.2. Oznaczanie stężenia związków na potrzeby analizy farmakokinetycznej

Procedurę oznaczania stężenia związków w badanych próbkach przeprowadzono w Laboratorium Bioanaliz Celon Pharma S.A. Analizowano stężenie 7,8-DHF oraz jego metabolitów: 7-hydroksy-8-metoksyflawon (7H8M-flawon) oraz 8-hydroksy-7-metoksyflawon (8H7M-flawon).

W tym celu, lewe półkule mózgowe zhomogenizowano w wodzie (3 mL wody na każdy gram tkanki mózgowej) z użyciem instrumentu FastPrep (MP Biomedicals). Następnie przygotowano próbki osocza i mózgu przez wytrącenie białek i ekstrakcję analitów przy użyciu acetonitrylu z dodatkiem wzorca wewnętrznego: 150 μ L roztworu ekstrakcyjnego dodano do 50 μ L materiału biologicznego, mieszano przez 1 min i odwirowano (10000x g, 4 min, 4 °C) i supernatant zebrano do analizy. Stężenie analitów w próbkach osocza i mózgu oznaczano za pomocą aparatu UPLC-MS / MS (Agilent Technologies) i kolumn chromatograficznych (Agilent Zorbax SB-C3 150 mm x3 mm x3,5 μ m). Stężenie związków w próbach określono na podstawie krzywych kalibracyjnej (o znanym stężeniu) dla poszczególnych analitów. Z uwagi na ograniczenia analityczne związane z identyczną masą molekularną 7H8M-flawonu oraz 8H7M-flawon, przedstawione na wykresie wyniki odpowiadają całkowitemu stężeniu obydwu metabolitów 7,8-DHF.

Po ustaleniu stężenia analitów w osoczu i mózgu zostały obliczone następujące parametry farmakokinetyczne:

C_{max}- stężenie maksymalne – średnie stężenie maksymalne analitu uzyskane w danym punkcie czasowym

T_{max}- czas osiągnięcia stężenia maksymalnego – punkt czasowy, w którym analit osiąga swoje stężenie maksymalne

AUC_(0-t)- pole powierzchni pod krzywą od 0 do ostatniego punktu pomiarowego

3.8.3. Analiza farmakodynamiczna

Wyizolowane struktury mózgowe (hipokamp i kora czołowa, patrz punkt 3.8.1) homogenizowano w buforze RIPA (Tabela 1) z użyciem homogenizatora ręcznego przez 2 min, na lodzie. Następnie, homogenaty odwirowano (8000x g, 10 min) w temperaturze 4 °C w celu oczyszczenia próbek z pozostałości fragmentów tkanek. Otrzymane w ten sposób preparaty białkowe wykorzystano do analizy efektu farmakodynamicznego poprzez analizę białek z zastosowaniem specyficznych przeciwciał (Tabela 3) oraz metody Western blot. Procedurę Western blot wraz z przygotowaniem próbek do elektroforezy opisano w rozdziale 3.6. Do analiz wykorzystano próbki zwierząt z grupy II i grupy III po 30 min i 2 h od podania związków (Tabela 4).

3.9. Badanie selektywności związku

W celu lepszego poznania właściwości farmakologicznych 7,8-DHF postanowiono zbadać selektywność związku wobec celów molekularnych, które wykazują aktywność farmakologiczną [202]. Badanie selektywności zlecono firmie Eurofins, która określiła wiązanie 7,8-DHF z celami molekularnymi w ramach panelu BioPrint®. Analizę wykonano względem 133 celów molekularnych obejmujących receptory sprzężone z białkami G, transportery, kanały jonowe, receptory jądrowe, kinazy oraz enzymy niebędące kinazami. Ocenę selektywności związku dokonano poprzez pomiar wiązania 7,8-DHF (w stężeniu 10 μ M) w obecności związku kontrolnego, specyficznego dla danego celu molekularnego. Dokładną listę analizowanych celów molekularnych i dedykowanego związku kontrolnego można odnaleźć w Tabeli Z3.

3.10. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SEM) z trzech biologicznych powtórzeń i trzech niezależnych technicznych eksperymentów. Graficzną prezentację wyników wraz z analizą statystyczną wykonano z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 7. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej wariancji (ANOVA) oraz testu porównań wielokrotnych Dunnetta.

4. WYNIKI

4.1. Przedmiot badań: biblioteka związków oraz małowzrostkowe związki referencyjne

Przedmiotem badań była biblioteka małowzrostkowych związków chemicznych, na którą składały się zsyntetyzowane przez departament Chemii Medycznej Celon Pharma S.A oryginalne, własne związki chemiczne oraz komercyjnie dostępna biblioteka związków. Bibliotekę związków stanowiło łącznie 987 związków, o 17 różnych chemotypach, które zsyntetyzowano/wyselekcjonowano na podobieństwo struktur chemicznych dla opisanych w piśmiennictwie agonistów TrkB.

Pulę związków referencyjnych stanowiły molekuly opisane w piśmiennictwie jako agoniści receptora TrkB oraz takie, co do których istnieją przesłanki wskazujące na zdolność tych związków do aktywacji receptora TrkB. W tabeli poniżej wskazano nazwy związków referencyjnych wraz z odniesieniem do piśmiennictwa (Tabela 5), zaś ich struktury chemiczne zaprezentowano w Tabeli Z1 w sekcji Załączniki.

Tabela 5. Lista związków referencyjnych opisanych w literaturze jako agoniści TrkB.

Nazwa związku	Przypis
7,8-dihydroksyflawon (7,8-DHF)	[176]
7,8,3'-trihydroksyflawon (7,8,3'-THF)	[182]
4'-dimetylamino-7,8-DHF (4'-DMA-7,8-DHF)	[182]
DMAQ-B1	[197]
GSB-106	[203]
LM22-A4	[194]
LM22-B10	[194]
HIOC	[195]
N-acetylo serotonina (NAS)	[196]
8-hydroksy-3-(4'-metoksyfenylo)-izokumaryna (izokumaryna)	[204]
OSSK-495385	[198]
NSI-189	[205]
2,5-dihydroksy-3,6-bis(1H-indol-3-yl)cycloheksa-2,5- diene-1,4-dion (numer wewnętrzny CPL503052)	[206]
2,5-dihydroksy-3-(1H-indol-3-yl)-6-[7-(3-metylobut-2- en-1-yl)-1H-indol-3-yl]cycloheksa-2,5-diene-1,4-dion (numer wewnętrzny CPL503071)	[206]
2,5-dihydroksy-3-[7-(3-metylobut-2-en-1-yl)-1H-in- dol-3-yl]cycloheksa-2,5-diene-1,4-dion (numer wewnętrzny CPL503113)	[207]

4.2. Badania przesiewowe w celu identyfikacji związków oddziałujących z zewnątrzkomórkową domeną receptora TrkB (exTrkB)

4.2.1. Zastosowanie metody mikroskalowej termoforezy kapilarnej w układzie *single-point* w celu wstępnej selekcji związków wykazujących oddziaływanie z exTrkB

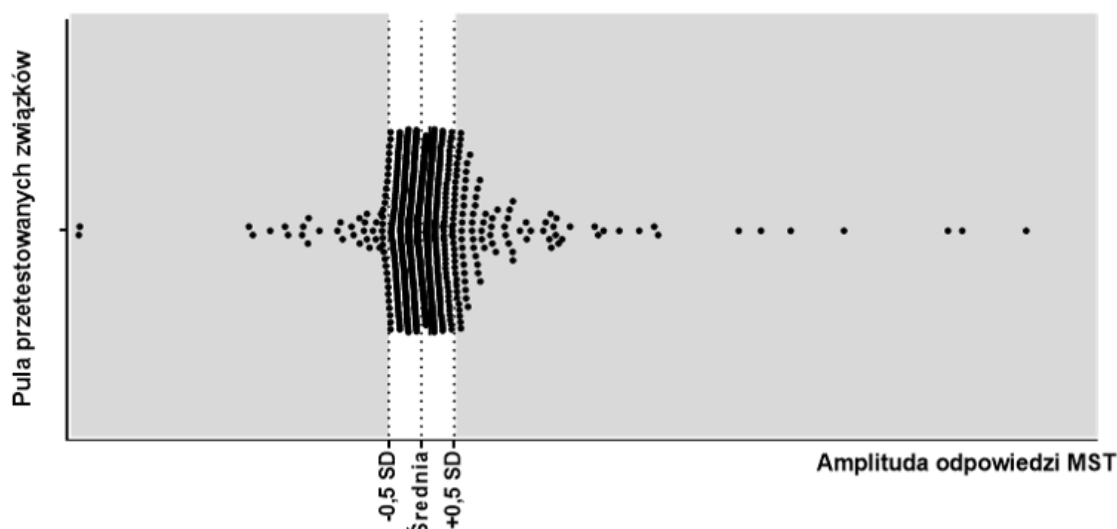
Na potrzebę przeprowadzenia badań przesiewowych, mających na celu wstępną selekcję związków wykazujących oddziaływanie z zewnątrzkomórkową domeną TrkB (exTrkB) zaadaptowano metodę mikroskalowej termoforezy kapilarnej (MST).

Zjawisko termoforezy mikroskalowej opiera się na zdolności przemieszczania się cząsteczek w mikroskopowym gradiencie temperatury. Ruchliwość cząsteczek jest związana z entropią otoczki hydratacyjnej wokół przemieszczających się molekuł. Każdy rodzaj cząsteczek oraz interakcje pomiędzy nimi, powodują zmiany masy molekularnej, ładunku i/albo konformacji, które powodują zmiany w otoczce hydratacyjnej, a co za tym idzie mogą być mierzone z wykorzystaniem MST. Powyższe zjawiska są monitorowane za pośrednictwem pomiaru poziomu fluorescencji. W rozprawie doktorskiej, receptor exTrkB sprzężono ze znacznikiem fluorescencyjnym, który został przyłączony do reszt w lizynach, aby skutecznie monitorować zachodzące interakcje pomiędzy cząsteczkami a receptorem.

Każdą z 987 molekuł pochodzących z biblioteki związków inkubowano z wyznaczonym białkiem exTrkB w określonym stężeniu i poddano mikroskalowej termoforezie kapilarnej. Na tym etapie, eksperymenty przeprowadzano w układzie *single-point*, co oznacza zastosowanie jednego stężenia związku badanego (0,5 mM). Zdolność wiązania związku z receptorem monitorowano poprzez określenie amplitudy odpowiedzi MST, czyli różnicy pomiędzy poziomem fluorescencji potencjalnie utworzonego kompleksu (związek-exTrkB), a bazowym sygnałem fluorescencji dla exTrkB (DMSO-exTrkB). Wzrost bądź spadek parametru amplitudy świadczą o zmianie ruchliwości termoforetycznej exTrkB w obecności związku badanego względem kontroli (DMSO-exTrkB), co wskazuje na potencjalne oddziaływanie tych cząsteczek z exTrkB.

Wyniki z przeprowadzonych analiz przedstawiono na wykresie poniżej (Rycina 5). Dla 214 związków chemicznych zaobserwowano wzrost/spadek wartości amplitudy MST. Za punkt odcięcia przyjęto wartość $\pm 0,5$ odchylenia standardowego (SD) dla

średniej wartości amplitudy odpowiedzi MST. W przedziale większym bądź równym $\pm 0,5$ SD znalazło się 181 związków, które zakwalifikowano do dalszych analiz.



Rycina 5. Wstępna identyfikacja związków oddziałujących z zewnątrzkomórkową domeną TrkB (exTrkB). Z użyciem techniki MST spośród 987 przebadanych związków zidentyfikowano 214 cząsteczek dla których zaobserwowano wzrost/spadek wartości amplitudy odpowiedzi MST. Wyznakowane fluorescencyjnie białko exTrkB inkubowano z badanym związkiem w układzie *single-point* MST (rozumiane jako jedno stężenie związku, 0,5 mM) i poddano termoforezie kapilarnej. Zdolność tworzenia kompleksu exTrkB-związek badany świadczący o interakcji molekule z białkiem exTrkB monitorowano poprzez pomiar zmiany poziomu fluorescencji exTrkB podczas termoforezy, który normalizowano do sygnału dla exTrkB inkubowanego z DMSO (amplituda odpowiedzi MST). Wykres przedstawia indywidualne wartości amplitudy odpowiedzi MST dla każdego z 987 przetestowanych związków. Przerywane linie stanowią punkt odcięcia odpowiadający wartości $\pm 0,5$ odchylenia standardowego (SD) dla średniej wartości amplitudy odpowiedzi MST 181 związków z przedziału $\geq \pm 0,5$ SD (przedział ten oznaczono na wykresie kolorem szarym) zakwalifikowano do dalszej charakterystyki oddziaływania.

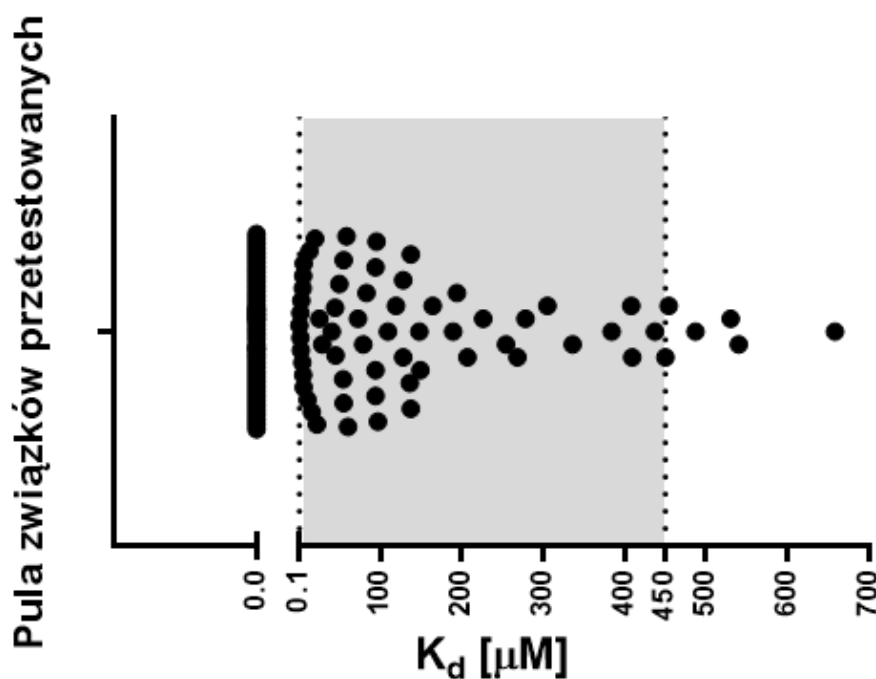
4.2.2. Określenie stałej dysocjacji (K_d) dla wyselekcjonowanych związków małocząsteczkowych.

Zdolność związków do wiązania z exTrkB zweryfikowano poprzez określenie parametru stałej dysocjacji K_d z wykorzystaniem techniki MST. Eksperyment polegał na inkubacji białka exTrkB ze związkiem chemicznym w szerokim zakresie stężeń, po czym próbkę poddano termoforezie mikroskalowej. Wartość K_d wyznaczono na podstawie intensywności emitowanej fluorescencji podczas MST, która zależy od poziomu frakcji exTrkB związanej z badaną cząsteczką. Zanim jednak przystąpiono do wyznaczenia K_d , dokonano turbidymetrycznej oceny rozpuszczalności związków w buforze do termoforezy.

Spośród 181 molekuł wyselekcjonowanych w poprzednim etapie, 68 związków chemicznych zostało usuniętych z analiz z uwagi na słabą rozpuszczalność.

Ostatecznie eksperymenty wykonano dla 113 związków, jednakże wartość K_d ustalono jedynie dla 64 cząsteczek i wynosi ona od 0,1 do 680 μM (Rycina 6). Dla 49 związków nie udało się wyznaczyć stałej dysocjacji, co świadczy o braku oddziaływania cząsteczek z exTrkB mimo, że w eksperymencie w układzie *single-point* zaobserwowano spadek/wzrost amplitudy. Szczegółowe wartości K_d dla poszczególnych związków zostały zaprezentowane w Tabeli Z2 w części Załączniki. Do dalszych analiz funkcjonalnych zakwalifikowano 59 związków chemicznych, dla których K_d znajduje się w przedziale 0,1–450 μM , co stanowi około 50% z puli związków przebadanych na tym etapie.

Wśród badanych cząsteczek znajdowały się także związki referencyjne oraz BDNF, w celu weryfikacji czy wykazują one interakcję z exTrkB. Jednakże spośród 15-tu przebadanych związków referencyjnych jedynie dla 7 cząsteczek udało się określić parametr stałej dysocjacji, który wynosił 1,3 do 44,2 μM . Wartość K_d dla BDNF określono na poziomie 0,093 μM . Otrzymane wyniki zaprezentowano w Tabeli 6.



Rycina 6. Wyznaczone wartości stałej dysocjacji (K_d) dla wyselekcjonowanych związków. Z użyciem metody mikroskalowej termoforezy kapilarnej z powodzeniem wyznaczono wartości K_d dla 64 związków. Z początkowej puli 181 związków wytypowanej na podstawie wartości amplitudy odpowiedzi MST, do wyznaczenia wartości K_d zakwalifikowano ostatecznie 113 związków z uwagi na ograniczenia

w rozpuszczalności. Stałą dysocjacji określono poprzez pomiar zmiany poziomu fluorescencji wyznaczonego exTrkB, który poddano termoforezie w gradiencie stężenia badanego związku. Wykres przedstawia indywidualne wartości stałej dysocjacji dla 113 przebadanych molekuł, z czego dla 64 z nich zawiera się ona w przedziale od 0,1 μM do 680 μM . Kolorem szarym oraz przerywanymi liniami oznaczono przedział wartości K_d 0,1–450 μM , będące punktem odcięcia przy wyborze związków do dalszych analiz. W tym przedziale wartości K_d znajdowało się 59 związków (stanowiąc $\sim 50\%$ przebadanych cząsteczek). Dla 49 cząsteczek nie wyznaczono K_d co jest równoznaczne z brakiem oddziaływania molekuł w badanym zakresie stężeń, co wskazano na wykresie jako $K_d = 0 \mu\text{M}$.

Tabela 6. Wartości K_d dla związków referencyjnych, które wyznaczono z zastosowaniem techniki MST.

Nazwa cząsteczki	K_d [μM]
BDNF	0,093
7,8-DHF	1,3
OSK495385	2,32
DMAQ-B1	5,6
LM22-B10	83
7,8,3'-THF	Nie wyznaczono
4'-dimetylamino-7,8-DHF	Nie wyznaczono
GSB-106	Nie wyznaczono
LM22-A4	Nie wyznaczono
HIOC	Nie wyznaczono
NAS	Nie wyznaczono
Izokumaryna	Nie wyznaczono
NSI-189	Nie wyznaczono
CPL503071	25
CPL503113	44,2
CPL503052	2,6

4.3. Ocena zdolności związków do aktywacji receptora TrkB w układzie ortosterycznego agonisty

Wielkość parametru stałej dysocjacji nie warunkuje aktywności funkcjonalnej związku, a dostarcza jedynie informacji o zdolności cząsteczki do oddziaływania z celem molekularnym. W związku z tym, wyselekcjonowane związki przebadano pod kątem zdolności do indukowania fosforylacji wewnątrzkomórkowej domeny receptora TrkB. W ten sposób określono aktywność ortosteryczną związków względem TrkB oraz wyznaczono wartość EC_{50} .

Do badań wykorzystano model linii komórkowej SN56 T48 ze stabilną nadekspresją receptora TrkB. Do hodowli komórek dodawano różne stężenia związków, po czym określono stopień aktywacji receptora TrkB poprzez analizę poziomu fosforylacji domeny wewnątrzkomórkowej na tyrozynie 706 (Tyr706) z użyciem metody ELFI. Spośród wszystkich 59 przebadanych związków małowcząsteczkowych zidentyfikowano 4 związki zdolne do aktywacji receptora TrkB (Rycina 7A). Pozostałe cząsteczki, dla których z sukcesem wyznaczono wartości K_d nie powodowały fosforylacji TrkB. Nie zidentyfikowano żadnych *innowacyjnych* związków małowcząsteczkowych zdolnych aktywować ortosterycznie receptor TrkB.

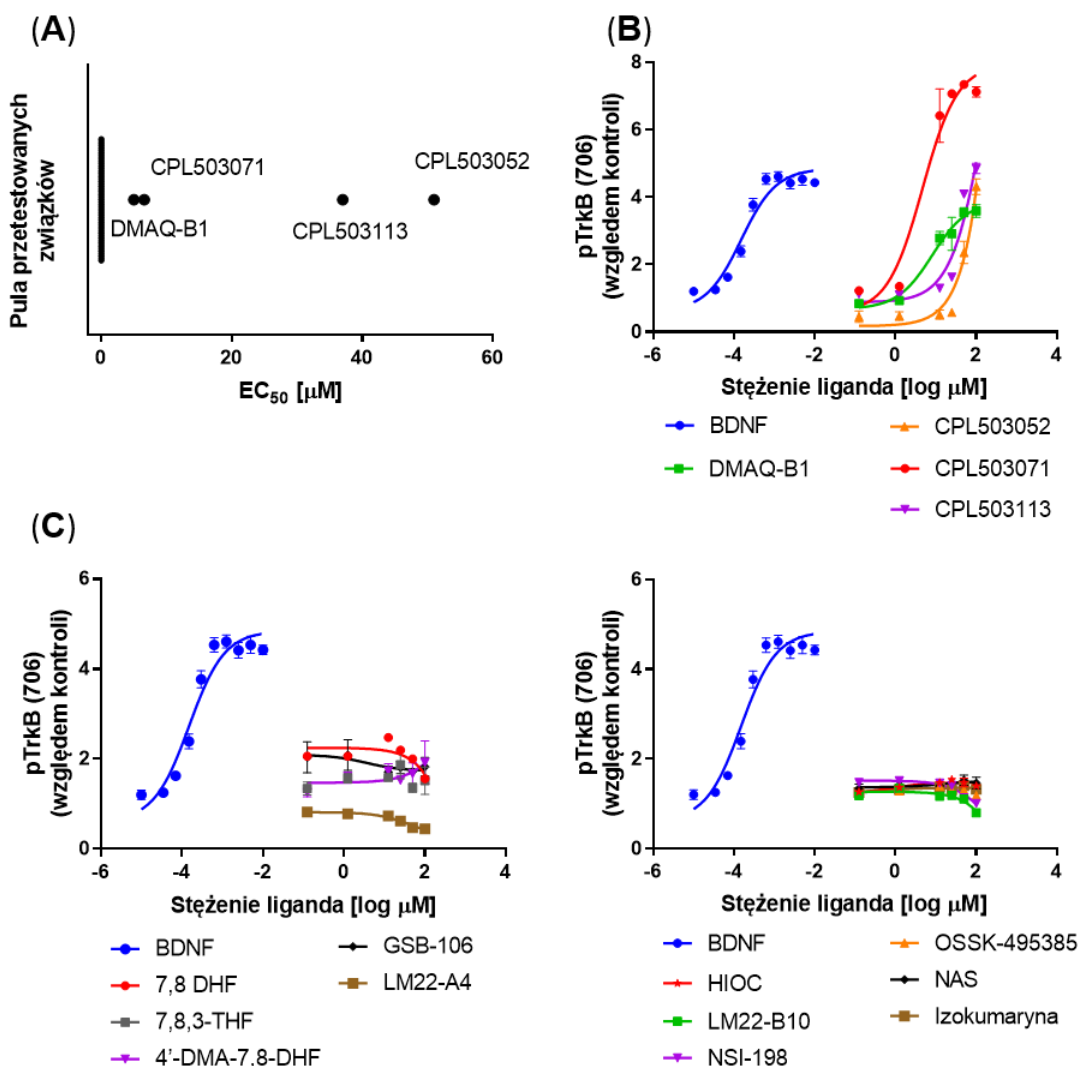
Aktywność ortosteryczną wykazują następujące molekuły, będące jednocześnie związkami referencyjnymi: DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113. Aktywność tych związków jest zdecydowanie niższa w porównaniu do BDNF (Rycina 7B) o czym świadczą wyznaczone wartości EC_{50} (Tabela 7). Pozostałe związki referencyjne również testowano na aktywność ortosteryczną, jednakże pozostają one bez wpływu na aktywność receptora TrkB (Rycina 7B).

Tabela 7. Wartości EC₅₀ określone dla związków referencyjnych. EC₅₀ wyznaczono na podstawie stopnia fosforylacji TrkB (Tyr706) metodą ELFI w modelu linii komórkowej SN56 T48. Wartość EC₅₀ równa 0 oznacza brak aktywności ortosterycznej związku.

Nazwa cząsteczki	EC ₅₀ [μM]
BDNF	0,004
7,8-DHF	0
OSK495385	0
DMAQ-B1	5
LM22-B10	0
7,8,3'-THF	0
4'-dimetylamino-7,8-DHF	0
GSB-106	0
LM22-A4	0
HIOC	0
NAS	0
Izokumaryna	0
NSI-189	0
CPL503071	6,6
CPL503113	37
CPL503052	51

Rycina 7. Ocena zdolności związków do aktywacji receptora TrkB w funkcjonalnym teście *in vitro*. Komórki linii SN56 T48 (hybrydoma mysich komórek neuronalnych izolowanych z przegrody przezroczystej oraz neuroblastomy N18TG2) ze stabilną nadekspresją receptora TrkB traktowano badanymi związkami w gradiencie stężeń. Aktywność receptora TrkB indukowaną ligandem mierzono poprzez analizę poziomu fosforylacji TrkB na tyrozynie 706 z użyciem specyficznego przeciwciała i metody ELFI. Stopień odpowiedzi komórek na traktowanie związkami porównywano względem kontroli (DMSO), a otrzymane wyniki posłużyły do wykreślenia krzywej odpowiedzi (pTrkB Tyr706) względem zastosowanego stężenia oraz wyliczenia wartości EC₅₀. Kontrole pozytywną stanowiły komórki traktowane BDNF. (A) Z puli 59 związków nie zidentyfikowano żadnej *innowacyjnej* cząsteczki zdolnej do aktywacji receptora TrkB, co wskazano na wykresie jako EC₅₀=0. Wzrost fosforylacji TrkB i tym samym aktywność ortosteryczną zaobserwowano dla 4 związków, które są związkami referencyjnymi. (B) Związki małocząsteczkowe zdolne do aktywacji TrkB prowokują jego fosforylację (Tyr706) w wyższym zakresie stężeń aniżeli BDNF, co odzwierciedlają wyznaczone krzywe odpowiedzi oraz wartości EC₅₀. Związki referencyjne opisywane w literaturze jako agoniści receptora TrkB nie indukują fosforylacji TrkB w modelu komórkowym SN56 T48 (C). Wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów, każdy z nich wykonano w 3 powtórzeniach. Słupki błędów reprezentują SEM.

(Rycina na następnej stronie)



Próba identyfikacji innowacyjnych, małowczątkowych agonistów TrkB nie przyniosła oczekiwanych rezultatów i ostatecznie zakończyła się niepowodzeniem – o czym świadczą uzyskane wyniki. Spośród biblioteki 987 związków chemicznych o 17-tu różnych chemotypach, nie udało się zidentyfikować innowacyjnej molekulej o cechach agonisty TrkB. Żaden z przebadanych związków chemicznych nie wykazywał jednocześnie wiązania z exTrkB podczas MST oraz nie powodował ortosterycznej aktywacji TrkB *in vitro*. Taki stan rzeczy wyklucza dalsze możliwości rozwoju przedklinicznego badanych molekuł jako agonistów TrkB.

Dodatkowo, przeprowadzone eksperymenty z wykorzystaniem związków referencyjnych wskazują na brak aktywności większości molekuł jako agonistów TrkB. Z puli 15-

tu przebadanych związków, jedynie DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113 powodują aktywację TrkB w warunkach *in vitro*. Powyższe wyniki, z jednej strony – podważają pierwotne doniesienia literaturowe dotyczące aktywności związków referencyjnych, z drugiej zaś – są spójne z wynikami otrzymanymi przez Todd i wsp., (2014) oraz Boltayev i wsp., (2017), co wspiera postulat o ograniczonych właściwościach związków jako agonistów TrkB [199,200]. Z tego też powodu, w dalszej części pracy skupiono się na badaniach, mających na celu rzetelną ocenę aktywności związków referencyjnych jako cząsteczek zdolnych do naśladowania funkcji BDNF.

4.4. Badanie aktywności związków referencyjnych w modelu allosterycznej modulacji TrkB

Z uwagi na brak obserwowanej aktywności ortosterycznej TrkB dla 11 związków referencyjnych, do których należą: 7,8-DHF, 7,8,3'-THF, 4'-DMA-7,8-DHF, GSB-106, LM22-A4, LM22-B10, HIOC, NAS, Izokumaryna, OSSK-495385, NSI-189 postanowiono przebadać efektywność tych cząsteczek w modelu allosterycznej modulacji.

W tym celu, komórki SN56 T48 stymulowano różnymi stężeniami naturalnego liganda TrkB (0,15-5 nM) oraz w obecności referencyjnego związku małowcząsteczkowego w trzech stężeniach (3, 10, 30 μ M) oraz samymi związkami (3, 10, 30 μ M). Po upływie 15 minut badano poziom fosforylacji TrkB (Tyr706) metodą ELFI po podaniu BDNF i określono wpływ związku na przebieg krzywej odpowiedzi dla BDNF. Związki będące pozytywnymi allosterycznymi modulatorami powinny wzmacniać odpowiedź komórki na BDNF, bądź też modulować aktywność receptora poprzez osiągnięcie jego aktywności przy niższych stężeniach naturalnego liganda (przesunięcie krzywej EC_{50} w kierunku niższych stężeń liganda).

Jak wynika z przebiegu krzywych odpowiedzi komórek na stymulację BDNF w obecności danego związku, żadna z testowanych cząsteczek nie moduluje aktywności receptora TrkB w przyjętym układzie eksperymentalnym (Rycina 8, str. 67-68). Otrzymane dotąd wyniki wskazują na brak zdolności związków do pozytywnej, allosterycznej modulacji receptora TrkB oraz brak aktywności testowanych związków referencyjnych jako ortosterycznych agonistów (Rycina 7C).

4.5. Określenie zdolności związków referencyjnych do indukowania dimeryzacji exTrkB

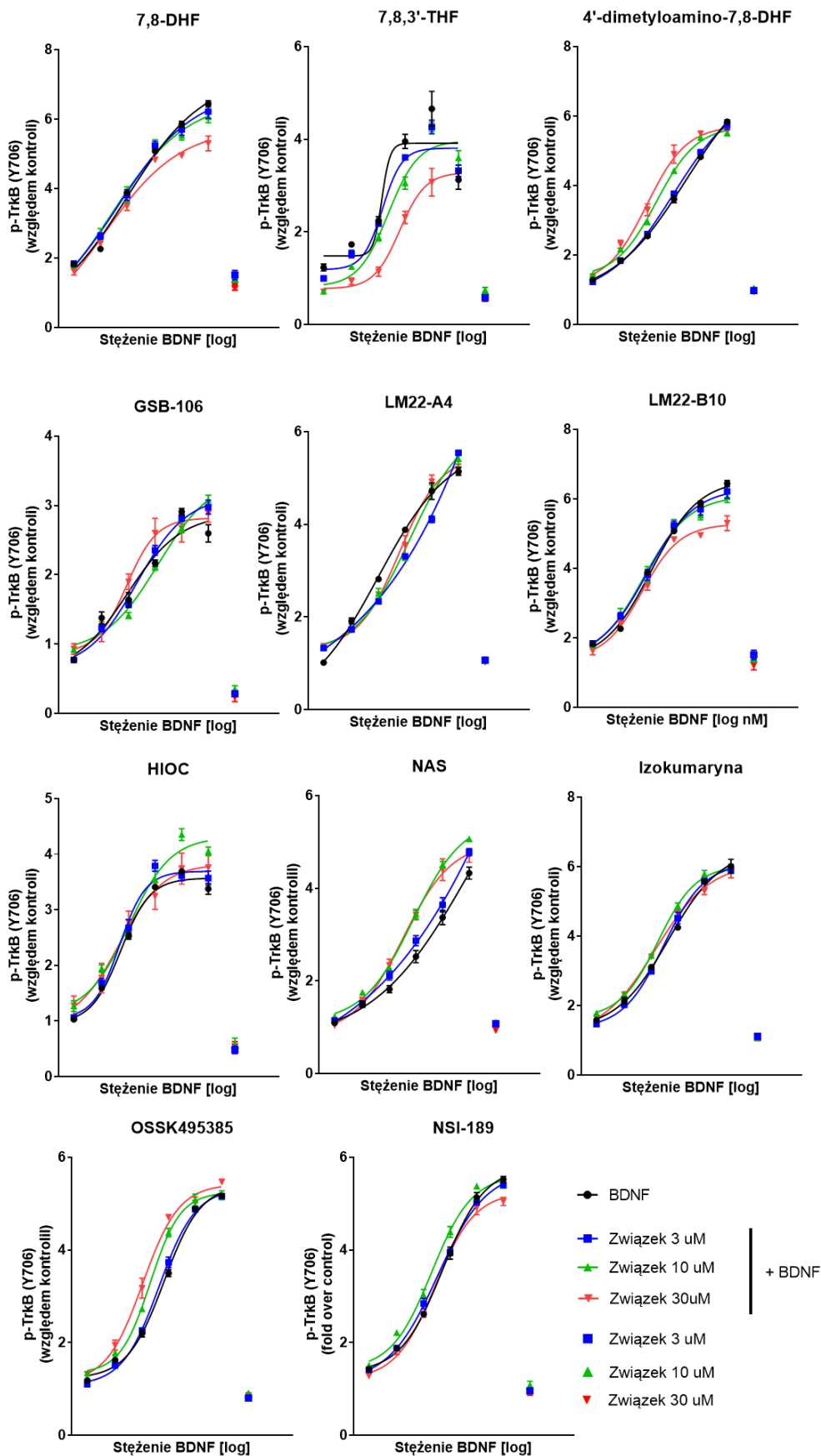
Zgodnie z dotychczasowym stanem wiedzy, dimeryzacja receptora TrkB pod wpływem liganda stanowi jeden z mechanizmów prowadzących do aktywacji receptora TrkB i dalszej transdukcji sygnału w komórce.

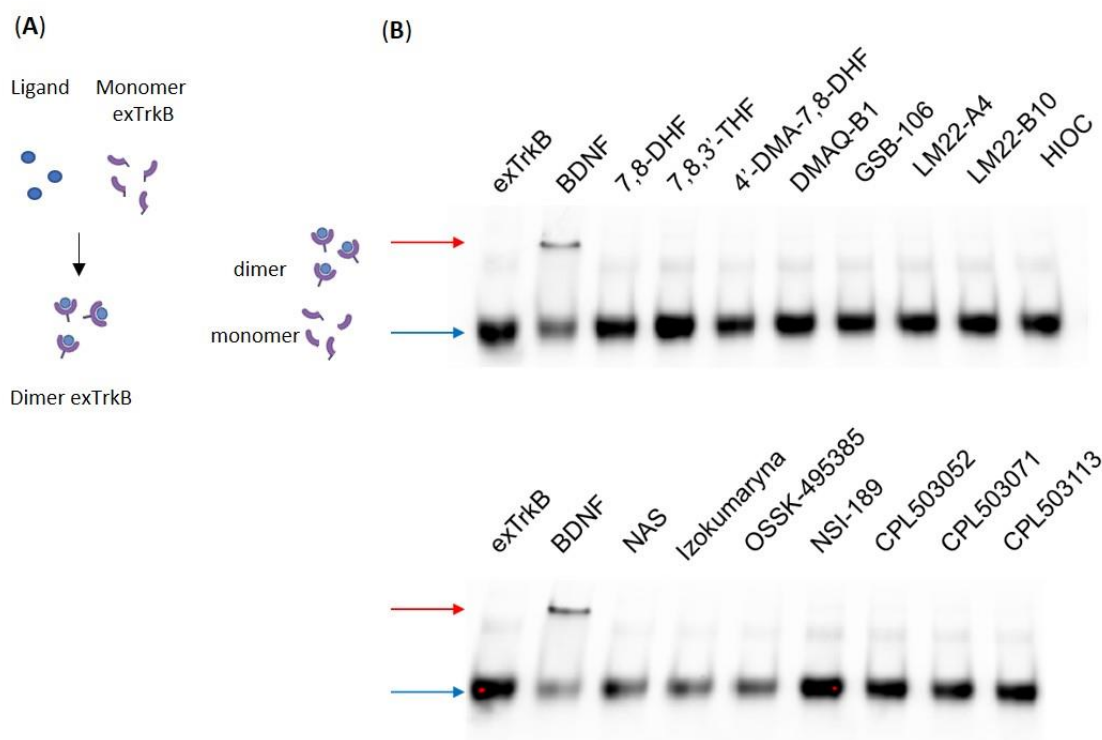
Dlatego też, postanowiono sprawdzić czy związki wykazujące aktywność ortosterycznych agonistów (DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113) również posiadają zdolność do indukowania dimeryzacji TrkB wykazując tym samym podobieństwo efektu jaki powoduje BDNF. Eksperymenty wykonano także dla pozostałych związków referencyjnych, dodatkowo weryfikując doniesienia literaturowe dotyczące ich właściwości jako agonistów TrkB.

Do doświadczeń wykorzystano zewnątrzkomórkową domenę TrkB, którą inkubowano ze związkami małowcząsteczkowymi oraz BDNF. Wpływ molekuł na dimeryzację exTrkB określono poprzez analizę migracji prążków w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych, co przedstawiono na uproszczonym schemacie na Rycinie 9A. Otrzymane wyniki potwierdzają zdolność BDNF do indukowania dimeryzacji exTrkB (Rycina 9B). Pomimo, iż związki DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113 powodują fosforylację TrkB w modelu komórkowym SN56 T48, cząsteczki te nie wykazują zdolności do indukowania dimeryzacji exTrkB. Podobne wyniki otrzymano dla pozostałych związków referencyjnych.

Rycina 8. Analiza aktywności związków w modelu allosterycznej modulacji. Komórki linii SN56 T48 z nadprodukcją receptora TrkB traktowano BDNF w gradiencie stężeń w obecności związków małowcząsteczkowych w trzech stężeniach. Poziom aktywacji TrkB oceniano stosując technikę ELFI oraz przy użyciu przeciwciał rozpoznających ufosforylowany receptor TrkB na tyrozynie 706. Stopień odpowiedzi komórek na traktowanie związkami i BDNF porównywano względem kontroli (DMSO), a otrzymane wyniki posłużyły do wykreślenia krzywej odpowiedzi (fosforylacja TrkB) względem zastosowanego stężenia BDNF. Panel przedstawia indywidualne wykresy odpowiedzi komórek na traktowanie BDNF oraz badanymi związkami. Żaden z 11 badanych związków referencyjnych (negatywnych w teście na aktywność ortosteryczną Ryc.7C) nie modulował odpowiedzi receptora TrkB na traktowanie BDNF, o czym świadczy brak przesunięcia krzywych względem osi X (niższe stężenie BDNF wymagane do aktywacji TrkB) oraz osi Y (zwiększany poziom p-TrkB po traktowaniu BDNF wywołany obecnością związku). Wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów, każdy z nich wykonano w 3 powtórzeniach. Słupki błędów reprezentują SEM.

(Rycina na następnej stronie)





Rycina 9. Analiza dimeryzacji zewnątrzkomórkowej domeny receptora TrkB indukowanej ligandem. (A) Uproszczony schemat dimeryzacji exTrkB pod wpływem liganda. (B) Związki małowcząsteczkowe oraz BDNF inkubowano z białkiem exTrkB po czym przeprowadzono elektroforezę w warunkach natywnych. Zdolność badanych ligandów do indukowania dimeryzacji exTrkB oceniono poprzez analizę migracji prążków w żelu poliakrylamidowym zgodnie z ich masą molekularną. Wyniki porównywano względem kontroli negatywnej [(DMSO) ścieżka numer 1] oraz pozytywnej (BDNF). Spośród przebadanych molekuł, jedynie BDNF jest zdolny indukować dimeryzację exTrkB, co na żelu widoczne jest w postaci wyższego prążka o większej masie molekularnej, oznaczonego odpowiednio czerwoną strzałką. Małowcząsteczkowe związki referencyjne nie indukują dimeryzacji exTrkB na co wskazuje niższy prążek, odpowiadający monomerom exTrkB (strzałka niebieska). Eksperyment wykonano w trzech niezależnych eksperymentach, na rycinie umieszczono reprezentatywny obraz wykonanej analizy.

4.6. Analiza aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od TrkB w modelach *in vitro* po traktowaniu referencyjnymi związkami małowcząsteczkowymi

4.6.1. Model linii komórkowej SN56 T48 z nadekspresją receptora TrkB

Aktywacja receptora TrkB prowadzi do fosforylacji jego domeny katalitycznej, co uruchamia wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałową. Proces ten jest związany z fosforylacją białek PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2.

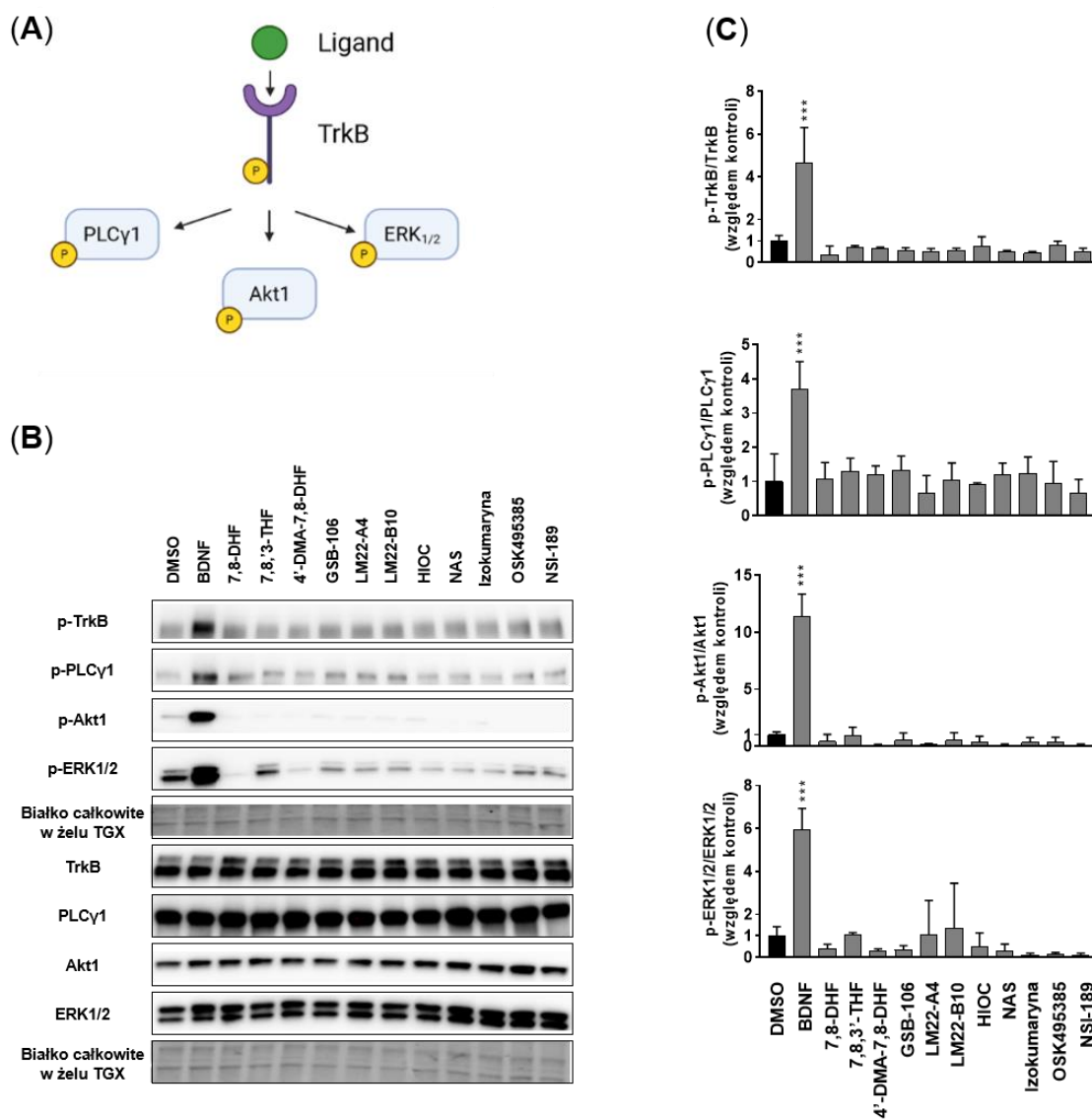
W pierwszej kolejności postanowiono sprawdzić, czy związki referencyjne zdolne są indukować szlaki sygnałowe zależne od aktywności receptora TrkB, mimo iż nie

wykazywały one efektywności w teście na aktywność ortosteryczną (patrz podrozdział 4.3) oraz w układzie allosterycznej modulacji w modelu linii komórkowej SN56 T48 (patrz podrozdział 4.4). W następnym kroku zweryfikowano stan pobudzenia ścieżek sygnałowych po traktowaniu związkami, które wykazywały aktywność agonistów TrkB (patrz podrozdział 4.3).

W tym celu, komórki linii SN56 T48 stymulowano referencyjnymi związkami małocząsteczkowymi: 7,8-DHF, 7,8,3'-THF, 4'-dimetylamino-7,8-DHF, GSB-106, LM22-A4, LM22-B10, HIOC, NAS, Izokumaryna, OSSK-495385, NSI-189 w stężeniu 100 μ M. Jako kontrolę pozytywną zastosowano BDNF. Po upływie 15 minut stymulacji komórek w zebranych próbkach analizowano poziom fosforylacji białek aktywowanych w odpowiedzi na pobudzenie ścieżki sygnałowej TrkB, co przedstawiono na uproszczonym schemacie (Rycina 10A). Zgodnie z oczekiwaniami, BDNF w sposób istotny indukuje fosforylację receptora TrkB na tyrozynie 706 (Rycina 10B oraz 10C). W konsekwencji dochodzi do transdukcji sygnału i wzmożonej fosforylacji białek PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2 (Rycina 10B oraz 10C). Stymulacja komórek wspomnianymi związkami małocząsteczkowymi, w tym 7,8-DHF, nie prowadzi do aktywacji receptora TrkB oraz nie powoduje fosforylacji białek efektorowych PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2 (Rycina 10B oraz 10C) co po raz kolejny wskazuje na brak aktywności tych związków *in vitro*.

Rycina 10. Analiza aktywacji ścieżek sygnałowych kontrolowanych aktywnością TrkB w modelu linii komórkowej SN56 T48. (A) Schemat badanej ścieżki sygnałowej. (B) Reprezentatywny obraz Western blot. Komórki linii SN56 T48 ze stabilną nadekspresją TrkB stymulowano przez 15 min związkami referencyjnymi, dla których wykazano brak aktywności ortosterycznej wobec TrkB w teście ELFI (Ryc. 3C). Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO, kontrolę pozytywną stanowiły komórki stymulowane BDNF. Zdolność związków do aktywacji ścieżki sygnałowej analizowano techniką Western blot z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających aktywne, ufosforylowane formy białek efektorowych: PLC γ 1 (p-PLC γ 1), Akt1 (p-Akt1) ERK1/2 (p-ERK1/2) oraz receptora TrkB (p-TrkB). Miejsca analizowanych fosforylacji w białkach wskazano w Tabeli 3 (patrz podrozdział 3.6.3). W celu potwierdzenia nałożenia równych ilości białka użyto przeciwciał rozpoznających całkowite białka PLC γ 1, Akt1, ERK1/2 i TrkB oraz zwizualizowano poziom całkowitego białka nałożonego na żel TGX, co umożliwiło wykonanie analizy densytometrycznej (C). Analiza Western blot wskazuje na brak zdolności związków do aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od TrkB, co stanowi przeciwieństwo dla efektu obserwowanego po stymulacji BDNF. Traktowanie BDNF istotnie podnosi poziom fosforylacji TrkB oraz białek efektorowych PLC γ 1, pAkt1 oraz ERK1/2 (B,C). Wyniki prezentowane na wykresach (C) przedstawione są jako krotność wzrostu poziomu fosforylacji względem kontroli negatywnej. Prezentowane wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów. Słupki błędów reprezentują SEM. Jednoczynnikowa analiza wariancji, test porównań wielokrotnych (*post-hoc*) Dunnett'a. *** $p < 0,001$.

(Rycina na następnej stronie)



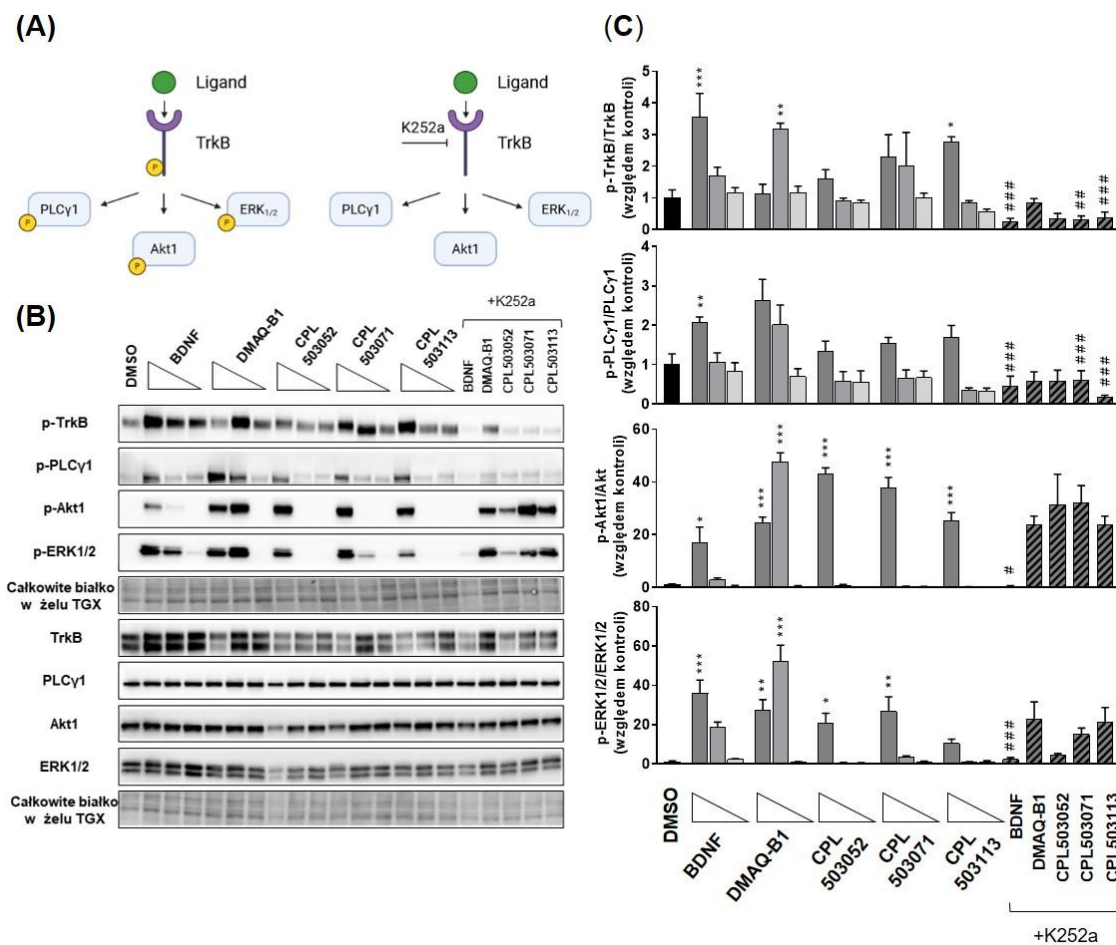
W dalszym etapie doświadczeń wykonano analizy, w których sprawdzono zdolność DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113 do pobudzenia ścieżek sygnałowych związanych z fosforylacją białek PLCγ1, Akt1 oraz ERK1/2. Równoległe, określono specyficzność działania tych związków poprzez jednoczesną, dodatkową stymulację komórek inhibitorem K252a. K252a jest inhibitorem domeny kinazowej receptora TrkB i blokuje dalsze przekazywanie sygnału, co przedstawiono na uproszczonym schemacie na Rycinie 11A.

Komórki linii SN56 T48 stymulowano badanymi cząsteczkami lub BDNF w trzech różnych stężeniach, w obecności lub braku inhibitora K252a. Po 15 minutach inkubacji

zebrano próbki, w których określono stopień aktywacji ścieżki sygnałowej TrkB. Otrzymane wyniki zaprezentowano na Rycinie 11B oraz Rycinie 11C. Jak się spodziewano, BDNF powodował proporcjonalny do stężenia wzrost fosforylacji TrkB oraz białek efektorowych PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2. Ponadto, otrzymane wyniki wskazują na specyficzny mechanizm aktywacji szlaku TrkB po podaniu BDNF, gdyż zastosowanie inhibitora K252a zablokowało aktywność TrkB i nie zaobserwowano fosforylacji białek sygnałowych. Związki małowcząsteczkowe również wykazały zdolność do pobudzenia analizowanej ścieżki sygnałowej. Profil fosforylacji TrkB, PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2 po podaniu testowanych cząsteczek jest indywidualny dla każdego ze związków i osiągają swój najsilniejszy efekt w zależności od zastosowanego stężenia. Niemniej jednak, o ile zastosowanie K252a znacznie zahamowało aktywność TrkB oraz PLC γ 1 po dodaniu badanych związków, to wciąż obserwuje się fosforylację pozostałych białek efektorowych. Efekt ten najmocniej wyraża się w przypadku związków DMAQ-B1, CPL503071 i CPL503113 dla białek p-Akt1 oraz p-ERK1/2. W przypadku CPL503052 w dalszym ciągu można zaobserwować silną fosforylację białka Akt1. Otrzymane wyniki wskazują na niespecyficzny, alternatywny i zachodzący równolegle mechanizm działania cząsteczek powodujący aktywację białek efektorowych w komórkach linii SN56 T48, niezależnie tylko od receptora TrkB.

Rycina 11. Analiza aktywacji ścieżek sygnałowych oraz ocena specyficzności działania związków w modelu linii komórkowej SN56 T48. (A) Schemat badanej ścieżki sygnałowej z uwzględnieniem efektu hamującego aktywację białek efektorowych pod wpływem K252a. (B) Reprezentatywny obraz analizy Western blot wraz z densytometrią (C). Komórki linii SN56 T48 ze stabilną nadekspresją TrkB traktowano przez 15 min związkami małowcząsteczkowymi w różnych stężeniach (100, 10, 1 [μ M]), dla których wykazano aktywność ortosteryczną wobec TrkB w teście ELFI (Ryc. 7C). Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO, kontrolę pozytywną stanowiły komórki stymulowane BDNF (100, 10, 1 [ng/mL]). W celu określenia specyficzności działania związków zastosowano inhibitor domeny kinazowej TrkB, który dodano na 15 min przed traktowaniem związkami badanymi. Analizę Western blot wykonano jak w Ryc 10. (B, C) BDNF indukuje aktywację TrkB i białek efektorowych PLC γ 1, Akt1, ERK1/2 w sposób zależny od dawki, a efekt ten jest znoszony inhibitorem K252a potwierdzając specyficzność działania BDNF względem TrkB. Badane związki małowcząsteczkowe wykazują niską specyficzność działania w ścieżce sygnałowej TrkB. DMAQ-B1 podobnie jak CPL503052, CPL503071, CPL503113 aktywuje TrkB i białka efektorowe, jednakże zablokowanie aktywności TrkB inhibitorem K252a nie skutkuje całkowitym wyciszeniem fosforylacji białek p-Akt1 oraz p-ERK1/2 wskazując na niezależny od TrkB, zachodzący alternatywnie i równolegle mechanizm działania związków. Prezentowane wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów. Słupki błędów przedstawiają SEM. Jednoczynnikowa analiza wariancji, test porównań wielokrotnych (*post-hoc*) Dunnett'a. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. DMSO; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. badany związek w 100 μ M.

(Rycina na kolejnej stronie)



4.6.2. Model różnicowanej SH-SY5Y z zaindukowaną nadekspresją TrkB

W związku z zaobserwowaną niską specyficznością związków w komórkach linii SN56 T48, w analogiczny sposób postanowiono zweryfikować aktywność cząsteczek (DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113 oraz 7,8-DHF) w modelu zróżnicowanych komórek ludzkiej linii neuroblastomy SH-SY5Y. Zastosowanie kwasu retinowego różnicuje komórki SH-SY5Y w kierunku komórek podobnych do neuronów dopaminergicznych i stanowi powszechnie stosowany model *in vitro* w badaniach neurologicznych [208]. Ponadto, kwas retinowy indukuje w komórkach neuroblastomy nadprodukcję receptora TrkB, co dodatkowo uzasadnia wykorzystanie tego modelu do badań związków małowcząsteczkowych w kontekście aktywacji tego receptora i zależnych ścieżek sygnałowych [209].

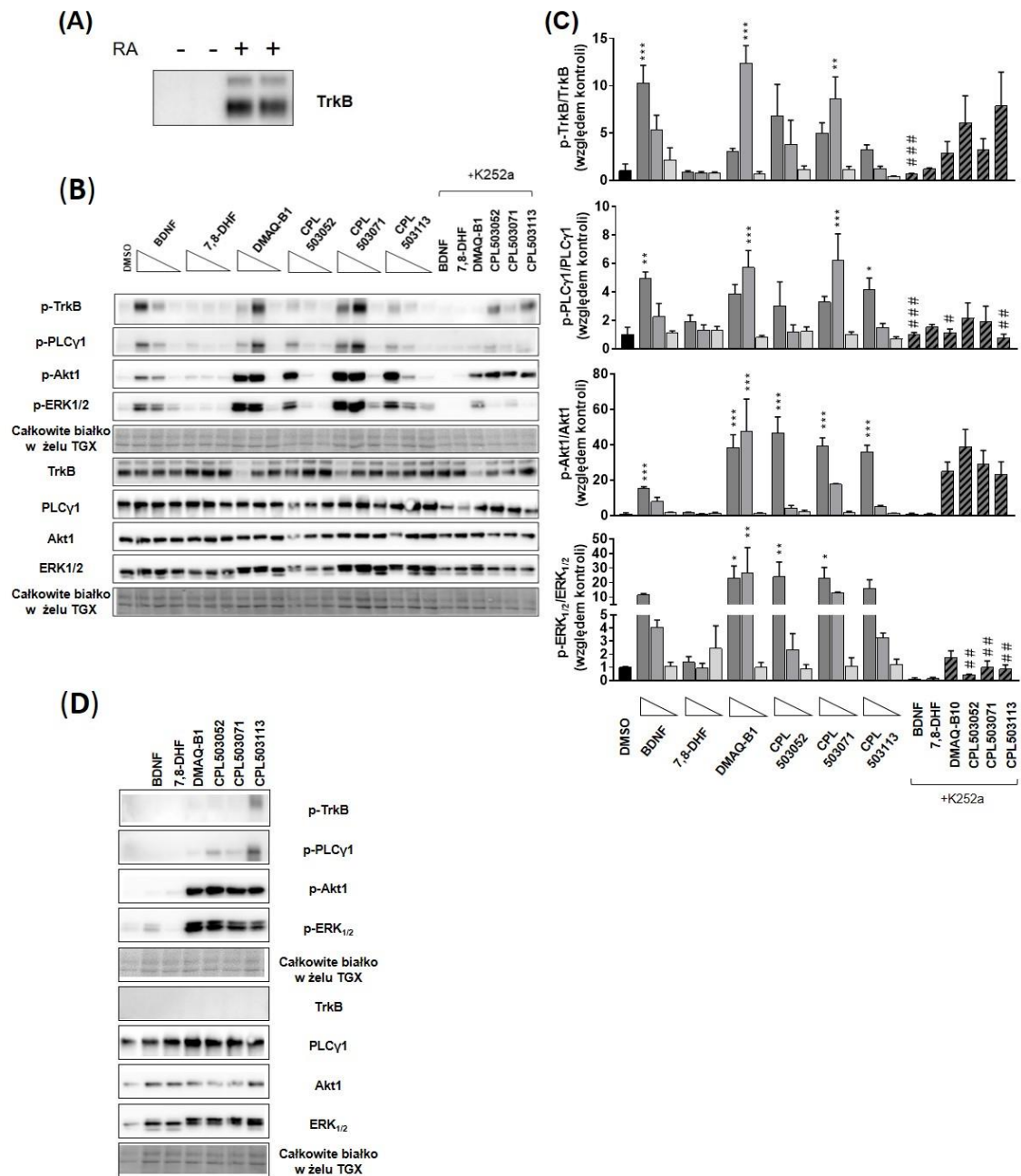
Eksperymenty rozpoczęto od zróżnicowania komórek linii SH-SY5Y poprzez inkubację komórek z kwasem retinowym przez 5 dni. Jak się spodziewano, kwas retinowy indukuje syntezę receptora TrkB, co potwierdziło możliwość użycia tego modelu do dalszych analiz (Rycina 12A). Następnie, komórki stymulowano dodając BDNF oraz związki: DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113, w obecności lub braku inhibitora K252a. Eksperymenty przeprowadzono także dla 7,8-DHF – wiodącego i szeroko opisanego w literaturze naukowej agonisty TrkB. Po 15 minutach po podaniu w zebranych próbkach określono stopień aktywacji ścieżki sygnałowej poprzez analizę poziomu fosforylacji TrkB oraz białek PLC γ 1, Akt1, ERK1/2.

Otrzymane wyniki zaprezentowano na Rycina 12B oraz Rycina 12C. Zgodnie z założeniami, BDNF indukuje fosforylację receptora TrkB a także PLC γ 1, Akt1, ERK1/2, co wskazuje na aktywację ścieżki sygnałowej przez BDNF w komórkach zróżnicowanej SH-SY5Y. Efekt ten jest zależny od zastosowanego stężenia i jest specyficzny, gdyż inhibitor K252a skutecznie hamuje aktywność katalityczną TrkB. Ponadto nie obserwowano efektu BDNF na aktywację białek efektorowych PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2 gdy zastosowano K252a. Spośród badanych cząsteczek jedynie DMAQ-B1 oraz CPL503071 istotnie zwiększył poziom fosforylacji TrkB, co przekłada się również na zwiększony poziom fosforylacji białek efektorowych PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2. Można również zauważyć, że CPL503052 oraz CPL503113, mimo iż nie wpływają znacząco na wzrost fosforylacji TrkB, to poziom p-PLC γ 1, p-Akt1 oraz p-ERK1/2 jest stosunkowo wysoki w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej DMSO. Jednakże efekt działania DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113 nie jest całkowicie zależny od aktywacji TrkB, gdyż poziom fosforylacji Akt1 nie jest hamowany w obecności inhibitora K252a. Co więcej, eksperymenty wykonane na niezróżnicowanych komórkach SH-SY5Y, w których poziom ekspresji TrkB utrzymuje się na nieznacznym poziomie, również wskazują na alternatywny od TrkB mechanizm działania tych związków (Rycina 12D). Stymulacja niezróżnicowanych komórek DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113 powoduje wzrost poziomu fosforylacji analizowanych białek efektorowych w tych komórkach. Takiego efektu nie obserwuje się po zastosowaniu BDNF, ponieważ z uwagi na niską ekspresję TrkB w komórkach SH-SY5Y, oraz specyficzność receptorową BDNF nie wywiera on wpływu na fosforylację białek analizowanej ścieżki (Rycina 12D).

W przypadku analiz wykonanych dla 7,8-DHF, nie zaobserwowano jakiegokolwiek aktywności związku. 7,8-DHF nie aktywuje receptora TrkB, a tym samym pozostaje bez wpływu na poziom fosforylacji białek efektorowych PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2 w komórkach zróżnicowanej (Rycina 12B, Rycina 12C) oraz nieróżnicowanej SH-SY5Y (Rycina 12D).

Rycina 12. Analiza ścieżki sygnałowej oraz ocena specyficzności związków w modelu różnicowanej linii komórkowej SH-SY5Y. (A) Różnicowanie komórek ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y kwasem retinowym (RA) indukuje nadekspresję receptora TrkB. Schemat badanej ścieżki sygnałowej jest analogiczny jak w Ryc.10A, którą badano metodą Western blot z użyciem specyficznych przeciwciał jak w przypadku Ryc.10B i 11B. (B) Zróżnicowane komórki SH-SY traktowano przez 15 min 7,8-DHF oraz związkami małowcząsteczkowymi w różnych stężeniach (100, 10, 1 [μ M]), dla których wykazano aktywność ortostatyczną wobec TrkB w teście ELFI (Ryc. 3C). Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO, kontrolę pozytywną stanowiły komórki stymulowane BDNF (100, 10, 1 [ng/mL]). Na 15 minut przed traktowaniem związkami, komórki inkubowano z inhibitorem K252a celem określenia specyficzności działania związków. BDNF aktywuje receptor TrkB oraz białka efektorowe (PLC γ 1, Akt1, ERK1/2) proporcjonalnie do zastosowanego stężenia. Efekt BDNF jest znoszony poprzez inhibicje domeny kinazowej inhibitorem K252a, co świadczy o specyficznej aktywacji ścieżek sygnałowych. Wyniki uzyskane dla nieróżnicowanych komórek SH-SY5Y potwierdzają specyficzny mechanizm działania BDNF, nie obserwuje się fosforylacji białek efektorowych w tych komórkach po traktowaniu BDNF gdyż nie wykazują one ekspresji receptora TrkB (D). Związki małowcząsteczkowe DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113 niespecyficjnie aktywują ścieżkę sygnałową. Zastosowanie K252a i zablokowanie aktywności TrkB nie wycisza fosforylacji Akt1 po stymulacji związkami (B,C). Dodatkowo, w odróżnieniu do DMSO i BDNF związki te indukują aktywację ścieżki sygnałowej (pAkt1, pERK1/2), pomimo iż w komórkach nieróżnicowanej SH-SY5Y poziom ekspresji TrkB zachodzi na niskim poziomie (D). 7,8-DHF wykazuje brak aktywności wobec TrkB w różnicowanej SH-SY5Y i nieróżnicowanej nie indukuje fosforylacji białek efektorowych (B, D). Reprezentatywne obrazy analizy Western blot dla komórek różnicowanych (B) oraz nieróżnicowanych (D). (C) Analiza densytometryczna wyników Western blot dla zróżnicowanych komórek SH-SY5Y. Prezentowane wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów. Słupki błędów przedstawiają SEM. Jednoczynnikowa analiza wariancji, test porównań wielokrotnych (*post-hoc*) Dunnett'a. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. DMSO; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. badany związek w 100 μ M.

(Rycina na kolejnej stronie)



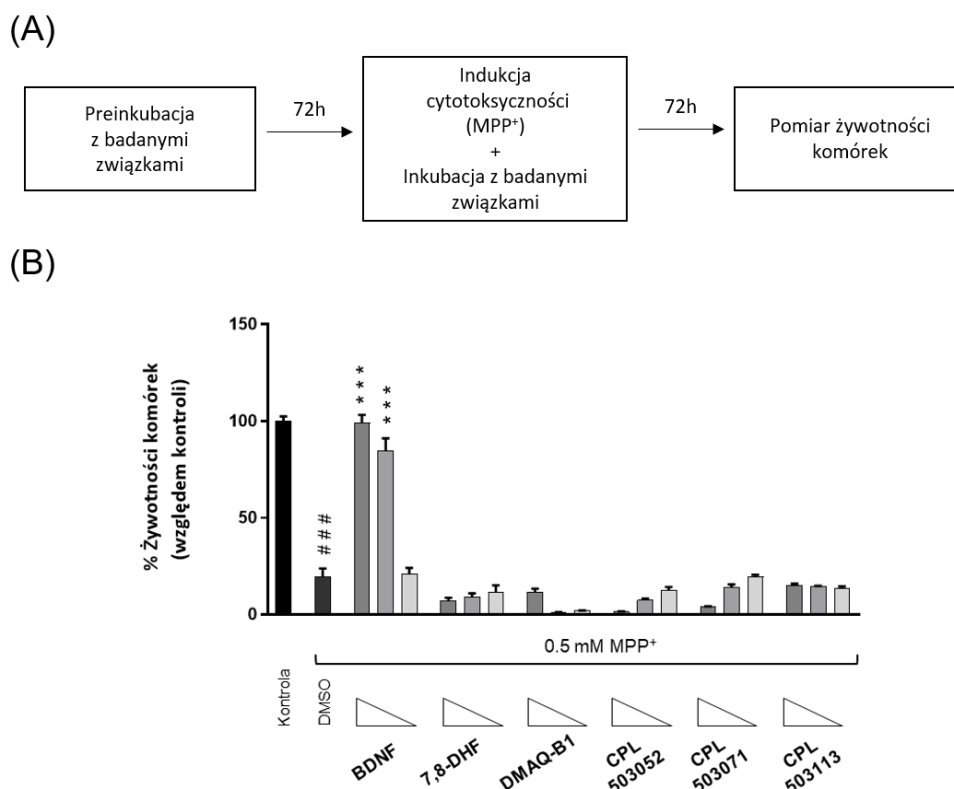
4.7. Ocena właściwości cytoprotekcyjnych referencyjnych związków małowcząsteczkowych.

BDNF za pośrednictwem receptora TrkB aktywuje ścieżki sygnałowe promujące przeżywanie komórek w warunkach stresowych, co nadaje mu właściwości neuro- i cytoprotekcyjne. Efekty ochronne zostały także wykazane dla małowcząsteczkowych agonistów TrkB, a w szczególności 7,8-DHF. W związku z tym, postanowiono sprawdzić, czy opisani w literaturze agoniści TrkB wykazują efekt funkcjonalny w postaci ochrony komórek, u których zaindukowano apoptozę neurotoksyną MPP⁺. MPP⁺ jest inhibitorem kompleksu I łańcucha oddechowego co prowadzi do spadku ATP i uruchomienia śmierci komórkowej na drodze apoptozy.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem modelu zróżnicowanej linii komórkowej SH-SY5Y. Uproszczony schemat przedstawiający przebieg eksperymentu zaprezentowano na Rycinie 13A. W pierwszej kolejności komórki inkubowano przez 72 godziny z BDNF bądź referencyjnym związkiem małowcząsteczkowym. Po tym czasie do komórek dodano MPP⁺ celem zaindukowania cytotoksyczności i dokonano oceny żywotności komórek po upływie kolejnych 72 h. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 13B. Jak się spodziewano, MPP⁺ istotnie zmniejsza żywotność komórek po 72 h, wykazując efekt cytotoksyczny. Dodanie BDNF powoduje zależny od dawki, pozytywny wpływ na przeżywalność komórek w obecności neurotoksyny. Wynik ten potwierdza ochronne właściwości BDNF w komórkach zróżnicowanej linii SH-SY5Y. Związki referencyjne DMAQB1, CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113, dla których wykazano niespecyficzny efekt aktywacji ścieżek molekularnych PLC γ 1, Akt1, ERK1/2 (patrz podrozdział 4.6) nie wpływają jednak ochronnie na żywotność komórek po zastosowaniu MPP⁺. Wynik ten świadczy o braku właściwości cytoprotekcyjnych tych związków

Inkubacja komórek z 7,8-DHF również nie przyniosła pożądanego efektu w postaci cytoprotekcji. Nie zaobserwowano zmiany poziomu żywotności komórek po upływie 72 h po dodaniu MPP⁺ w obecności 7,8-DHF.

Pozostałe związki referencyjne do których należą: 7,8,3'-THF, 4'-DMA-7,8-DHF, GSB-106, LM22-A4, LM22-B10, HIOC, NAS, izokumaryna, OSSK-495385, NSI-189 również nie wykazują właściwości ochronnych w przyjętym modelu doświadczalnym.



Rycina 13. Ocena właściwości cytoprotekcyjnych związków w modelu różnicowanej SH-SY5Y. (A) Schemat eksperymentu. (B) Zróżnicowane komórki SH-SY5Y traktowano przez 72 h 7,8-DHF oraz związkami małowcząsteczkowymi w różnych stężeniach (3, 1, 0,3 μM), dla których wykazano efektywność w teście na aktywność ortosteryczną wobec TrkB (Ryc. 3C). Jako kontrolę ujemną zastosowano DMSO, kontrolę pozytywną stanowiły komórki stymulowane BDNF (100, 10, 1 [ng/mL]). Efekt cytoprotekcyjny oceniano poprzez analizę żywotności komórek z użyciem chemiluminescencyjnego testu Real-Time Glo po upływie kolejnych 72 h od zaindukowania cytotoksyczności z użyciem MPP⁺. Zastosowanie MPP⁺ wykazuje efekt cytotoksyczny i istotnie zmniejsza żywotność komórek. BDNF wykazuje dawko-zależny efekt cytoprotekcyjny w zróżnicowanych komórkach SH-SY5Y po wywołaniu cytotoksyczności. Badane związki małowcząsteczkowe nie wpływają pozytywnie na żywotność komórek po zastosowaniu MPP⁺ wykazując brak efektu cytoprotekcyjnego. Wyniki przedstawiono jako procent żywotności względem komórek traktowanych DMSO (kontrola) bez obecności MPP⁺. Wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów, każdy z nich wykonano w 3 powtórzeniach. Słupki błędów reprezentują SEM. Jednoczynnikowa analiza wariancji, test porównań wielokrotnych (*post-hoc*) Dunnett'a. ### p < 0,001 vs. DMSO/-MPP⁺; *** p < 0,001 vs. DMSO/+ MPP⁺.

Otrzymane dotąd wyniki wskazują, iż związki referencyjne opisane w literaturze jako agoniści TrkB wykazują ograniczone właściwości jako ligandy receptora TrkB. W Tabeli 8 podsumowano wszystkie wyniki analiz dla badanych związków referencyjnych użytych w rozprawie. Eksperymenty, w których oceniano zdolność wiązania związków do exTrkB, wskazują, że tylko nieliczne z nich zdolne są do interakcji z exTrkB, ale żaden nie indukuje jego dimeryzacji. Szereg związków referencyjnych: 7,8-DHF, 7,8,3'-THF, 4'-dimetylamino-7,8-DHF, GSB-106, LM22-A4, LM22-B10, HIOC, NAS,

Izokumaryna, OSSK-495385, NSI-189 nie wykazuje efektywności w teście na aktywność ortosteryczną bądź też nie modulują allosterycznie aktywności TrkB w obecności BDNF w modelu komórkowym SN56 T48. Co więcej, nie wykazano także wpływu tych związków na aktywność wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych związanych z fosforylacją białek PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2 w zastosowanych modelach *in vitro*. Z kolei dla związków DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113 wykazano aktywność ortosteryczną względem receptora TrkB, jednakże wyniki późniejszych analiz wskazują na niespecyficzny mechanizm działania tych związków. Związki te aktywują szlaki sygnałowe PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2 także niezależnie od receptora TrkB. W testach funkcjonalnych, gdzie oceniano właściwości cytoprotekcyjne cząsteczek, żaden z badanych związków małowcząsteczkowych nie wykazuje aktywności. Powyższe wyniki pokazują, iż przebadane cząsteczki wykazują ograniczoną bądź brak pożądaną aktywności jako agonistów TrkB. Wyniki te są po pierwsze sprzeczne z pierwotnymi doniesieniami ale spójne z wynikami Todd i wsp. (2014) oraz Boltaev i wsp. (2017), po drugie – uzasadniają zaprzestanie ich dalszego rozwoju przedklinicznego jako agonistów TrkB [199,200].

Należy podkreślić, iż otrzymane wyniki badań dla 7,8-DHF dotyczące aktywności funkcjonalnej *in vitro* są sprzeczne z przyjętym w literaturze dogmatem. Ponieważ w literaturze 7,8-DHF jest uznawany jako najlepiej działający małowcząsteczkowy agonista TrkB. Opublikowane wyniki jasno wskazują na związek pomiędzy aktywacją TrkB oraz zależnych od niego ścieżek sygnałowych, a efektem farmakologicznym po zastosowaniu 7,8-DHF. Dlatego też, niezwykle interesujące wydawało się sprawdzenie, czy 7,8-DHF posiada aktywność agonisty TrkB w warunkach *in vivo*, czego nie zaobserwowano w testowanych modelach *in vitro*. W dalszej części pracy szczególną uwagę skupiono na analizach farmakologicznych, w których określono profil farmakokinetyczny i efekt farmakodynamiczny 7,8-DHF u myszy.

Tabela 8. Podsumowanie wyników badań dla analizowanych związków referencyjnych oraz BDNF.

Nazwa cząsteczki	K _d [μM]	EC ₅₀ [μM]	Aktywność allosteryczna	Dimeryzacja exTrkB	Pobudzenie ścieżek sygnałowych <i>in vitro</i>	Właściwości cytoprotekcyjne
BDNF	0.093	0.004	-	TAK	TAK	TAK
7,8-DHF	1.3	0	NIE	NIE	NIE	NIE
OSK495385	2.32	0	NIE	NIE	NIE	NIE
DMAQ-B1	5.6	5	NIE	NIE	NIESPECYFICZNIE	NIE
LM22-B10	83	0	NIE	NIE	NIE	NIE
7,8,3'-THF	0	0	NIE	NIE	NIE	NIE
4'-DMA-7,8-DHF	0	0	NIE	NIE	NIE	NIE
GSB-106	0	0	NIE	NIE	NIE	NIE
LM22-A4	0	0	NIE	NIE	NIE	NIE
HIOC	0	0	NIE	NIE	NIE	NIE
NAS	0	0	NIE	NIE	NIE	NIE
Izokumaryna	0	0	NIE	NIE	NIE	NIE
NSI-189	0	0	NIE	NIE	NIE	NIE
CPL503071	25	6.6	NIE	NIE	NIESPECYFICZNY	NIE
CPL503113	44.2	37	NIE	NIE	NIESPECYFICZNY	NIE
CPL503052	2.6	51	NIE	NIE	NIESPECYFICZNY	NIE

4.8. Badania farmakologiczne *in vivo* nad 7,8-DHF

4.8.1. Analiza profilu farmakokinetycznego po doustnym i dożylnym podaniu związku

Zanim przystąpiono do eksperymentów mających na celu określenie wpływu 7,8-DHF na aktywację receptora TrkB w tkankach mózgowych myszy, wyznaczono najpierw profil farmakokinetyczny związku. Znajomość farmakokinetyki umożliwi ocenę m.in. biodostępności, dystrybucji oraz ekspozycji organizmu na związek, co przekłada się na efektywność farmakologiczną danej molekuly.

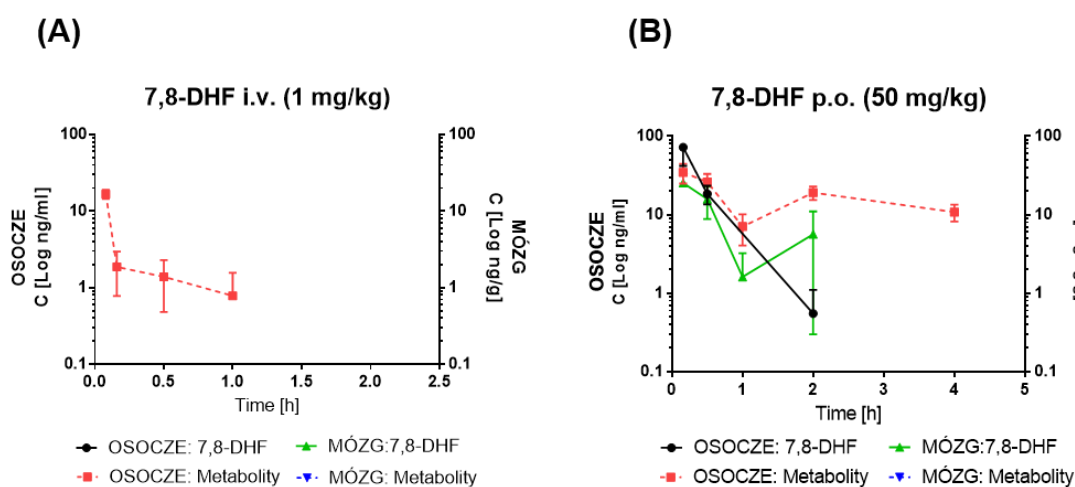
Do badań wykorzystano myszy szczepu BALB/c, którym podawano 7,8-DHF drogą doustną (*p.o.*) oraz dożylną (*i.v.*). Dawki związku, które podano zwierzętom ustalono na podstawie danych literaturowych oraz badań formulacyjnych przeprowadzonych przez Dział Rozwoju Produktów Leczniczych Celon Pharma S.A. W ustalonych punktach czasowych od momentu podania związku pobierano krew i oznaczano stężenie 7,8-DHF w surowicy. Od zwierząt pobierano również mózg, w którym w jednej z półkul także mierzono stężenie 7,8-DHF celem określenia zdolności związku do penetracji bariery krew-mózg, drugą z półkul przeznaczono do badań farmakodynamicznych. Z otrzymanych wyników wykreślono krzywą zależności stężenia w czasie od podania 7,8-DHF w osoczu i tkance mózgowej, co przedstawia Rycina 14A dla podania dożylnego oraz na Rycina 14B dla podania doustnego.

Otrzymane wyniki wskazują na niekorzystny profil farmakokinetyczny 7,8-DHF u myszy. Przede wszystkim, jest to związane z szybką eliminacją 7,8-DHF z organizmu. Po podaniu dożylnym związek jest niewykrywalny zarówno w osoczu jak i w tkance mózgowej (Rycina 14A). Ponadto, po podaniu doustnym 7,8-DHF osiąga maksymalne stężenie w surowicy po 10 minutach od podania, po czym gwałtownie spada do poziomu poniżej detekcji po upływie 1 h (Rycina 14B). 7,8-DHF jest wykrywalny w mózgu po podaniu doustnym, co sugeruje zdolność związku do penetracji bariery krew-mózg. Niemniej jednak, stężenie związku w mózgu myszy osiąga niski poziom, co pozwala twierdzić, że poziom ekspozycji tego narządu na 7,8-DHF jest niski.

Na podstawie wykreślonych krzywych stężenia związku dla podania *p.o.* oraz *i.v.* wyznaczono podstawowe parametry farmakokinetyczne tj.: C_{max} (stężenie maksymalne), T_{max} (czas, w którym osiągane jest C_{max}) oraz $AUC_{(0-t)}$ (pole pod krzywą – parametr wskazujący na ogólny poziom ekspozycji organizmu na związek). Wyniki parametrów PK przedstawiono w Tabeli 9.

Dodatkowo, w próbkach surowicy i mózgu wyznaczono poziom metabolitów 7,8-DHF: 7-hydroksy-8-metoksyflawonu (7H8M-flawon) oraz 8-hydroksy-7-metoksyflawonu (8H7M-flawon), gdyż istniejące przesłanki literaturowe wskazują na aktywny udział tych metabolitów w aktywacji receptora TrkB. Krzywe stężenia 7H8M-flawonu oraz 8H7M-flawonu po dożylnym oraz doustnym podaniu 7,8-DHF przedstawiono odpowiednio na Rycina 14A oraz Rycina 14B, zaś wyznaczone parametry

farmakokinetyczne zawarto w Tabela 9. Z uwagi na ograniczenia bioanalityczne związane z identyczną masą molekularną analitów, prezentowane wyniki dotyczą całkowitego stężenia obydwu metabolitów. Jak wynika z przeprowadzonych analiz, metabolity 7,8-DHF są wykrywalne jedynie w surowicy, osiągając maksymalne stężenie po 5 minutach od podania dożylnego (Rycina 14A, Tabela 9) oraz po 10 minutach od podania doustnego (Rycina 14B, Tabela 9), co sugeruje szybką eliminację związku z organizmu. Metabolity 7,8-DHF nie są wykrywane w mózgu zarówno po podaniu *i.v.* oraz *p.o.*, co potwierdza niską ekspozycję tego narządu na związek oraz analizowane metabolity (Rycina 14A, Rycina 14B, Tabela 9).



Rycina 14. Profil farmakokinetyczny 7,8-DHF w modelu mysim. (A) Wykres zmiany stężenia 7,8-DHF oraz jego metabolitów (7-hydrokso-8metoksyflawon oraz 8-hydrokso-7-metoksyflawon) w osoczu (lewa oś rzędnych) oraz mózgu myszy (prawa oś rzędnych) w jednostce czasu po dożylnym (*i.v.*) podaniu związku. W osoczu, 7,8-DHF osiąga swoje stężenie maksymalne (C_{max}) (16,72 ng/mL) po 5 minutach od podania i całkowicie zanika po upływie 1 godziny od podania. 7,8-DHF jest niewykrywalny w mózgu po podaniu dożylnym w dawce 1 mg/kg. Nie wykryto metabolitów 7,8-DHF zarówno w osoczu jak i mózgu myszy. (B) Wykres zmiany stężenia 7,8-DHF oraz jego metabolitów (7-hydrokso-8metoksyflawon oraz 8-hydrokso-7-metoksyflawon) w osoczu (lewa oś rzędnych) oraz mózgu myszy (prawa oś rzędnych) w jednostce czasu po doustnym (*p.o.*) podaniu związku. 7,8-DHF osiąga maksymalne stężenie w osoczu (77,42 ng/mL) po 10 min od podania i zanika po upływie 2 h. Metabolity są wykrywalne w osoczu do 4 h od podania 7,8-DHF osiągając swoje C_{max} (34,68 ng/mL) po 10 minutach. Stężenie 7,8-DHF w mózgu osiąga swoje maksimum (6,35 ng/mL) po 10 minutach od doustnego podania związku i zanika po upływie 2 h. Nie wykryto metabolitów 7,8-DHF w mózgu. Słupki błędów prezentują SD. Każda z grup eksperymentalnych liczyła po cztery osobniki ($n=4$) na każdy z punktów czasowych dla podania dożylnego i doustnego.

Tabela 9. Parametry farmakokinetyczne 7,8-DHF oraz jego metabolitów w mózgu oraz osoczu myszy po dożylnym (*i.v.*) i doustnym (*p.o.*) podaniu związku.

		7,8 -DHF <i>i.v.</i> (1 mg/kg)			7,8 -DHF <i>p.o.</i> (50 mg/kg)		
		AUC _(0-t)	C _{max}	T _{max} (h)	AUC _(0-t)	C _{max}	T _{max} (h)
OSOCZE	7,8-DHF	N/D	N/D	N/D	20.9	72.42 ng/mL	0.16
	7H8M-flawon 8H7M-flawon	2.2	16.72 ng/mL	0.08	61.8	34.68 ng/mL	0.16
MÓZG	7,8-DHF	N/D	N/D	N/D	5.2	6.35 ng/g	0.16
	7H8M-flawon 8H7M-flawon	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

C_{max}- stężenie maksymalne

T_{max}- czas, w którym związek osiąga swoje C_{max}

AUC_(0-t)- pole pod krzywą. Wyniki odnoszą się do krzywych z Ryc. 15A-B.

N/D- niemożliwe do określenia

7H8M-flawon (7-hydroksy-8metoksyflawon); 8H7M-flawon (8-hydroksy-7-metoksyflawon)

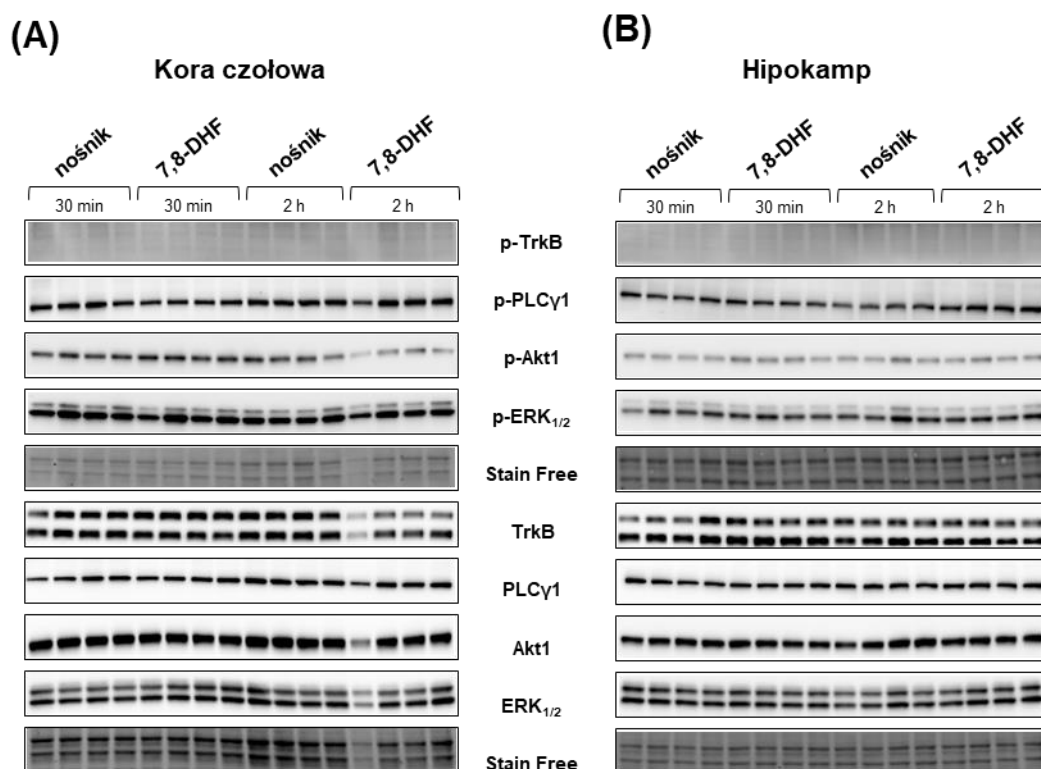
4.8.2. Analiza farmakodynamiczna *ex vivo* w tkankach mózgowych myszy po doustnym podaniu związku.

W dalszej kolejności zbadano efekt farmakodynamiczny 7,8-DHF *ex vivo*. Analizowano poziom aktywacji TrkB i zależnych ścieżek sygnałowych w strukturach mózgowych myszy.

Badania przeprowadzono na materiale pozyskanym podczas badania farmakokinetycznego. Do eksperymentów wykorzystano tkanki osobników, które otrzymały związek doustnie, gdyż jedynie dla tego podania wykazano obecność związku w mózgu (patrz podrozdział 4.8.1). Z wyizolowanych półkul mózgowych wypreparowano hipokamp oraz korę czołową, w których oceniano wpływ 7,8-DHF na aktywację receptora TrkB oraz ścieżek sygnałowych PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2 po 30 min i 2h od podania związku oraz nośnika. Hipokamp i kora czołowa to struktury mózgowe, które zgodnie z piśmiennictwem wykazują najwyższy poziom białka TrkB [210]. W związku z czym, efekt działania 7,8-DHF na TrkB powinien być widoczny szczególnie w tych strukturach.

Wyniki z przeprowadzonych analiz wskazują, że 7,8-DHF podany w dawce 50 mg/kg oraz stężenie, jakie osiąga w mózgu, nie powoduje fosforylacji receptora TrkB zarówno

w korze czołowej (Rycina 15A) jak i hipokampie myszy (Rycina 15B) w badanych punktach czasowych. Brak efektu aktywacji TrkB po podaniu 7,8-DHF wyraża się także na poziomie ścieżek sygnałowych, gdyż nie obserwuje się wzrostu fosforylacji białek PLC γ 1, Akt1 oraz ERK1/2. Równocześnie, nie można jednoznacznie określić wpływu metabolitów 7,8-DHF na analizowany efekt farmakodynamiczny, ponieważ jak wynika z analizy PK, stężenie 7H8M-flawonu oraz 8H7M-flawonu w mózgach analizowanych myszy znajdowało się poniżej progu detekcji (patrz podrozdział 4.8.1).



Rycina 15. Analiza farmakodynamiczna w tkankach mózgowych myszy po doustnym podaniu 7,8-DHF. Pozyskane podczas badania farmakokinetycznego tkanki mózgowie (kora czołowa i hipokamp) posłużyły do oceny efektu farmakodynamicznego 7,8-DHF po 30 min i 2 h od doustnego podania związku (50mg/kg). Analizowano ścieżkę sygnałową zależną od receptora TrkB (schemat Ryc.6A) wykorzystując w tym celu metodę Western blot, stosując procedurę analogicznie jak w Ryc.6. 7,8-DHF a także potencjalnie jego metabolity nie wpływają pozytywnie na poziom fosforylacji receptora TrkB oraz białek efektorowych (PLC γ 1, Akt1, ERK1/2) w korze czołowej (A) oraz hipokampie (B) w analizowanych punktach czasowych. Rycina przedstawia reprezentatywny wynik analizy Western blot. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach, a liczebność grupy wynosiła 4 osobniki/punkt czasowy ($n=4$).

Na podstawie wyników badań *in vivo* można stwierdzić, że 7,8-DHF jest związkiem o niekorzystnym profilu farmakokinetycznym i wykazującym niską biodostępność u myszy. Jednakże, nie można jednoznacznie ustalić, czy brak obserwowanej aktywności TrkB po ostrym podaniu 7,8-DHF jest wypadkową niskiej ekspozycji mózgu na działanie 7,8-DHF, czy też dlatego, że związek nie wykazuje cech agonisty TrkB.

4.9. Określenie selektywności 7,8-DHF względem szerokiego panelu celów molekularnych.

W celu kompleksowej charakterystyki farmakologicznej 7,8-DHF zbadano selektywność wiązania związku z innymi celami molekularnymi. W świetle uzyskanych wyników *in vivo*, wydaje się być całkiem prawdopodobne, że publikowany efekt farmakologiczny 7,8-DHF udowodniony w licznych modelach *in vivo* nie wynika jedynie z jego interakcji z receptorem TrkB [211].

Badanie selektywności 7,8-DHF przeprowadzono w ramach panelu BioPrint® Profile Panel (Eurofins). Profilowanie farmakologiczne uwzględniało przetestowanie 133 różnych celów molekularnych. Eksperymenty polegały na wyznaczeniu wpływu 7,8-DHF na inhibicję wiązania związku kontrolnego, specyficznego dla danego celu molekularnego.

W Tabeli 10 zebrano otrzymane wyniki oddziaływania 7,8-DHF z celami molekularnymi dla których wykazano istotny (> 50%) stopień inhibicji wiązania specyficznego związku kontrolnego. Wykazano, że 7,8-DHF oddziałuje z 12 celami molekularnymi. 7,8-DHF wypiera bądź łączy się w miejscu wiązania agonistów m.in. dla receptorów adenylozynowych A₁, A_{2A} oraz A₃, receptorem dla melatoniny typu 3 (MT₃), receptorem serotoninowym typu 2B (5-HT_{2B}) oraz GABA-ergicznym kanałem jonowym w miejscu wiązania dla benzodiazepin (BZD). 7,8-DHF hamuje wiązanie antagonisty receptora adenylozynowego A_{2A} oraz inhibitorów dla enzymów: oksydazy ksantynowej, cyklooksygenazy typu 2 (COX2), metaloproteinaz 9 i 2 (MMP-9, MMP-2) oraz kinazy Lyn A. Wyniki wiązania 7,8-DHF ze wszystkimi analizowanymi celami molekularnymi zawarto w Tabeli Z3 w części Załączniki. Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że 7,8-DHF wykazuje niską selektywność farmakologiczną i jest zdolny do interakcji z wieloma celami molekularnymi.

Tabela 10. Wyniki selektywności 7,8-DHF względem różnych celów molekularnych. 7,8-DHF w stężeniu 10 μ M został przebadany w panelu BioPrint® (badanie zewnętrzne, Eurofins). Eksperyment obejmował badanie wiązania 7,8-DHF z białkami należącymi do różnych rodzin w tym: receptory sprzężone z białkami G, transportery, kanały jonowe, receptory jądrowe, kinazy oraz enzymy niebędące kinazami. W tabeli zawarto wyniki dla celów molekularnych, wobec których 7,8-DHF w stężeniu 10 μ M wykazywał więcej niż 50% inhibicji wiązania specyficznego dla kontroli.

Cel molekularny	Badany charakter oddziaływania	Rodzina	% Inhibicji wiązania specyficznego dla kontroli
A ₁	Agonista	Receptor	99
Oksydaza ksantynowa	Inhibitor	Enzym niebędący kinazą	91,5
MT ₃ (ML ₂)	Agonista	Receptor	86
COX2	Inhibitor	Enzym niebędący kinazą	81,6
A _{2B}	Antagonista	Receptor	78,3
A _{2A}	Agonista	Receptor	74,9
MMP-9	Inhibitor	Enzym niebędący kinazą	72
BZD	Agonista	Kanał jonowy	70,6
A ₃	Agonista	Receptor	68,2
MMP-2	Inhibitor	Enzym niebędący kinazą	56,5
Kinaza Lyn A	Inhibitor	Kinaza	52,6
5-HT _{2B}	Agonista	Receptor	50,2

5. DYSKUSJA

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej realizowanej w ramach programu *Doktorat Wdrożeniowy* była próba identyfikacji innowacyjnych cząsteczek, zdolnych do wiązania i aktywacji receptora TrkB, które równocześnie naśladowałyby efekty wywoływane przez BDNF. Dodatkowo z uwagi na podniesione w literaturze wątpliwości dotyczące aktywności ortosterycznej TrkB dla związków referencyjnych dokonano szczegółowej charakterystyki tych cząsteczek w odniesieniu do ich powinowactwa, aktywacji TrkB oraz właściwości funkcjonalnych. Powyższe założenia badawcze zrealizowano poprzez zastosowanie innowacyjnej platformy badawczej polegającej na wykorzystaniu odpowiednich technik przesiewowych oraz testów funkcjonalnych do identyfikacji cząsteczek- potencjalnych agonistów TrkB spośród biblioteki związków o zróżnicowanych chemotypach. Opracowana platforma badawcza stanowi dodatkową, aplikacyjną wartość projektu, która potencjalnie może zostać skomercjalizowana. Ponadto, w pracy szczególną uwagę poświęcono 7,8-DHF, uznawanego w literaturze jako najlepiej działający małowcząsteczkowy agonista TrkB. Określono dla niego najważniejsze parametry farmakologiczne odnoszące się do jego właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych i do nieznanymi dotąd interakcji z innymi białkami.

Niniejsza rozprawa jest odpowiedzią na narastającą potrzebę medyczno-społeczną związaną z poszukiwaniem innowacyjnych terapii, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu depresji. Biologiczne funkcje jakie BDNF pełni w organizmie sprawiają, że szlak BDNF-TrkB jest atrakcyjnym i obiecującym celem do rozwijania nowych terapii celowanych, wykorzystujących związki małowcząsteczkowe jako agonistów TrkB. Rozwój terapii opartej na związkach chemicznych będących mimetykami BDNF wydaje się być dodatkowo uzasadniony z uwagi na niemożność wykorzystania BDNF jako autonomicznej terapii, mimo iż wiele prac naukowych wskazuje na leczniczy potencjał BDNF w chorobach neuropsychiatrycznych [9,10,212].

Projekt rozpoczęto od przeprowadzenia badań przesiewowych związków małowcząsteczkowych ukierunkowanych na cel molekularny (*target-based screen*). Przedmiotem badań była biblioteka 987 związków chemicznych o 17 różnych chemotypach. Celowo i zgodnie z przyjętą praktyką zadbano o heterogenność struktur chemicznych, aby możliwie jak najbardziej zwiększyć prawdopodobieństwo identyfikacji związków

oddziałujących z exTrkB [213]. W tym celu przeprowadzono badania przesiewowe z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej– metody szeroko stosowanej w kampaniach badawczych związanych z poszukiwaniem nowych kandydatów na lek [214,215]. Z uwagi na średnią przepustowość aparatu do mierzenia termoforezy w mikroskali, wielkim wyzwaniem byłoby określenie stałej dysocjacji (K_d) dla wszystkich dysponowanych molekuł. Dlatego też, do badań przesiewowych wykorzystano podejście, w którym określono parametr amplitudy odpowiedzi MST badanego związku, definiowany jako różnica poziomu fluorescencji pomiędzy sygnałem bazowym (exTrkB-DMSO), a kompleksem exTrkB-związek, który badano w jednym zadanym stężeniu. Zastosowana strategia pozwoliła odrzucić z dalszych analiz związki niewykazujące powinowactwa do receptora oraz zidentyfikować 214 cząsteczek, które wykazują interakcje z exTrkB. Z tej puli związków do kolejnego etapu wybrano 181 cząsteczek, które znajdowały się w przedziale większym bądź równym $\pm 0,5$ (SD) dla średniej wartości amplitudy odpowiedzi MST.

W kolejnym kroku, dla wyselekcjonowanych związków wyznaczono stałą dysocjacji, co pozwoliło uszeregować związki pod względem najlepszego oddziaływania z exTrkB. Niemniej jednak, dla części cząsteczek mimo wyznaczenia parametru amplitudy MST, nie udało się określić wartości K_d , co świadczy o braku oddziaływania związku z celem molekularnym. Powodem takiego stanu rzeczy może być możliwość otrzymania wyników fałszywie dodatnich na etapie badań przesiewowych. Niewykluczone bowiem, że zastosowane stężenie związku (0,5 mM), przy którym wyznaczano poziom amplitudy odpowiedzi MST, mogło być na tyle wysokie, że badany związek zdołał niespecyficznie wchodzić w interakcje z celem molekularnym, co z kolei wywarło efekt na zmianę poziomu fluorescencji podczas MST. Ryzyko związane z otrzymaniem wyników fałszywie dodatnich nie jest rzadkim zjawiskiem i nie stanowi ograniczenia samej metody MST [214,215]. Wiele technik wykorzystywanych do biofizycznej charakterystyki oddziaływań pomiędzy cząsteczkami obarczona jest ryzykiem dostarczania fałszywie dodatnich bądź ujemnych wyników, na co zwracają uwagę eksperci [216,217]. Ponadto, istotą testów o wysokiej przepustowości (HTS) jest możliwość oceny jak największej ilości związków w jak najkrótszym czasie, co można osiągnąć m.in. poprzez zastosowanie jednego stężenia związku w badaniach (jak w przypadku *single-point* MST). Tak więc selekcja związków stanowiących populację wyników fałszywie dodatnich bądź ujemnych nie jest istotnym problemem, gdyż potencjał takich cząsteczek jest następnie

weryfikowany w kolejnych etapach (np. określenie wartości K_d). Zastosowane podejście i przeprowadzone doświadczenia pozwoliły usunąć z dalszych kosztownych i czasochłonnych analiz *in vitro* cząsteczki o słabym rokowaniu. Z początkowej puli 214 związków, dla których zarejestrowano różnicę amplitudy MST, 181 cząsteczek zakwalifikowano do wyznaczenia K_d . Jednakże, ostateczne analizy wykonano dla 113 związków (68 związków usunięto z analiz z uwagi na słabą rozpuszczalność) a wartości K_d z sukcesem wyznaczono dla 64 cząsteczek.

Do kolejnych analiz wybrano 59 związków będących w przedziale K_d 0,1-450 μM . Potencjał wyselekcjonowanych cząsteczek został zweryfikowany w teście na aktywność ortosteryczną wobec TrkB w modelu komórkowym SN56 T48 do czego wykorzystano metodę ELFI. Wyniki uzyskane dla BDNF potwierdzają użyteczność testu do oceny aktywności związków, gdyż z sukcesem wyznaczono wartość EC_{50} , przy której BDNF indukuje fosforylację TrkB ($EC_{50} = 4 \text{ nM}$). Identyfikacja aktywnych związków, zdolnych indukować fosforylację TrkB była kluczowa na tym etapie projektu, determinując jego kontynuację i możliwość dalszego rozwoju cząsteczek. Niemniej jednak, żaden z badanych *innowacyjnych* związków nie indukował fosforylacji TrkB. Otrzymane wyniki w konfrontacji z wynikami K_d zdają się wskazywać na niespecyficzne wiązanie cząsteczek, w miejscu innym niż wymagane do ortosterycznej aktywacji TrkB. Jak dotąd nie udało się ustalić struktury krystalicznej pełnego kompleksu TrkB-BDNF, niemniej wskazano, że miejscem dokowania ligandów dla receptora TrkB jest domena Ig2 [92,218]. Użyta w doświadczeniach zewnątrzkomórkowa domena TrkB (exTrkB) o pełnej długości zawiera więc postulowaną sekwencję wiążącą dla ortostatycznych agonistów, co dodatkowo potwierdzają wyniki K_d uzyskane dla BDNF (93 nM). Podsumowując, żadna z innowacyjnych cząsteczek testowana w obrębie 17 różnych chemotypów nie była zdolna wiązać się z receptorem w miejscu krytycznym dla ortosterycznej aktywacji TrkB, co potwierdzono w modelu linii komórkowej SN56 T48 z nadekspresją receptora TrkB. Otrzymane negatywne wyniki stanowiły podstawę do zaprzestania dalszego rozwoju związków innowacyjnych jako potencjalnych kandydatów na lek.

Prezentowane tu badania przesiewowe nie są pierwszą próbą identyfikacji małowyczących agonistów TrkB, które zakończyły się niepowodzeniem. Boltaev i wsp., (2017) do badań przesiewowych wykorzystali komercyjnie dostępne platformy *in vitro*, poszukując związków aktywnych pośród biblioteki ponad 40 tysięcy związków

chemicznych. Pierwsza faza badań (ang. *primary screening*) doprowadziła do identyfikacji 335 związków aktywnych w modelu linii komórkowej U2OS-TrkB(DiscoverX PathHunter), jednakże badacze nie uzyskali żadnej cząsteczki zdolnej do aktywacji TrkB w pierwotnych hodowlach neuronów [200]. Autorzy nie zaobserwowali też aktywności *in vitro* dla opublikowanych wówczas agonistów TrkB: 7,8-DHF, LM22-A4, deoksygedunina – co stanowiło potwierdzenie wyników uzyskanych przez Todd i wsp. (2014) [199]. Aktywność związków 7,8-DHF, NAS, LM22-A4 względem TrkB została zakwestionowana wcześniej, gdyż zgodnie z badaniami Todd i in., 2014 związki te nie wykazywały aktywności w modelach linii komórkowych (DiscoverX i PathHunter) oraz pierwotnych hodowlach neuronalnych. Niemniej jednak do tej pory nie przeprowadzono holistycznych badań, które jednocześnie dostarczyłyby informacji o interakcji z TrkB oraz właściwościach funkcjonalnych *in vitro* dla omawianych związków oraz tych o postulowanej aktywności ortosterycznej TrkB. Dlatego też, w niniejszej pracy przeprowadzono kompleksowe, wielopoziomowe badania ustalające właściwości opublikowanych związków referencyjnych w kontekście modulacji TrkB oraz naśladowania funkcji BDNF. Do badań wybrano małowcząsteczkowe związki chemiczne o potwierdzonej literaturowo aktywności względem TrkB: 7,8,3'-THF, 4'-dimetylamino-7,8-DHF, DMAQ-B1, GSB-106, LM22-A4, LM22-B10, HIOC, NAS, OSSK-495385 oraz te o postulowanej aktywności ortosterycznej: izokumaryna, NSI-189 oraz cząsteczki o numerach wewnętrznych CPL503052, CPL503071, CPL503113 (nazwa systematyczna zawarta w Tabeli 5). Do związków referencyjnych należy także wiodący i szeroko opisany w literaturze związek 7,8-DHF, który szczegółowo zostanie omówiony w dalszej części rozdziału.

Dla części badanych związków referencyjnych nie udało się wyznaczyć wartości K_d , co stanowiło pierwszą przesłankę wskazującą na ograniczone funkcje związków jako agonistów TrkB. Brak interakcji z exTrkB wykazano dla 7,8,3-THF, 4'-dimetylamino-7,8-DHF, GSB-106, LM22-A4, HIOC, NAS, izokumaryny oraz NSI-189. Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że wymienione związki małowcząsteczkowe także nie aktywują funkcjonalnie receptora TrkB. Przeprowadzone analizy wykazały, że aktywność ortosteryczną *in vitro* w modelu SN56 T48 zaobserwowano jedynie dla DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113. Co zaskakujące, związki referencyjne, dla których zaobserwowano interakcje z exTrkB, czyli OSK495385 oraz LM22-B10, także nie powodowały wzrostu fosforylacji TrkB w komórkach SN56 T48. Otrzymane wyniki

pokazują, że OSK495385 i LM22-B10 nie wchodzi w interakcję z receptorem w odpowiedni sposób, co oznacza że związki te nie wiążą się z receptorem w miejscu koniecznym dla aktywacji TrkB, stąd też nie aktywują ortostatycznie receptora TrkB *in vitro*.

Uzyskane negatywne wyniki skłoniły do weryfikacji hipotezy, która zakładała, że referencyjne związki małowcząsteczkowe mogą funkcjonować jako allosteryczne modulatory TrkB. Dane literaturowe wskazują na aktywność *in vitro* związków 7,8,3-THF, 4'-dimetylamino-7,8-DHF, GSB-106, LM22-A4, HIOC, NAS. Tak więc niewykluczone, że allosteryczna modulacja TrkB może stanowić fundament mechanizmu działania tych związków w warunkach *in vitro*. Z punktu widzenia farmakologicznego taka właściwość cząsteczek byłaby również pożądana [219,220]. Niska aktywność TrkB spowodowana niskim poziomem BDNF w stanach chorobowych, mogłaby zostać przywrócona właśnie na drodze allosterycznej modulacji. Taka strategia stanowi podstawę wielu terapii celowanych w przypadku innych celów molekularnych, takich jak receptory wapniowe CaSR (cynakalcet), GABA_A (diazepam, alaprazol, breksanolon) oraz receptory Sig1R (fenytoina) [221–223]. Ponadto, postuluje się, że niektóre antydepresanty tj. imipramina czy fluoksetyna mogą allosterycznie modulować sygnalizację BDNF [224].

W związku z powyższym, komórki SN56 T48 stymulowano BDNF w obecności związku małowcząsteczkowego po czym oceniano wpływ badanych związków na poziom fosforylacji TrkB i przesunięcie krzywej odpowiedzi komórek. Otrzymane wyniki obalają przyjętą hipotezę i wskazują na brak potencjału związków referencyjnych do allosterycznej modulacji ścieżki BDNF-TrkB. Wyniki moich badań po raz kolejny dostarczyły dowodów na to, że aktywność związków referencyjnych: 7,8,3-THF, 4'-dimetylamino-7,8-DHF, GSB-106, LM22-A4, HIOC, NAS, izokumaryna oraz NSI-189, względem receptora TrkB jest ograniczona.

Dimeryzacja monomerycznych podjednostek receptora pod wpływem liganda stanowi kanoniczny model aktywacji receptorów RTK. Zarówno BDNF jak i inne ligandy TrkB (NT4/5) indukują tworzenie dimeru kompleksu receptora, co determinuje dalszą transdukcję sygnału [110,225]. Aby możliwie jak najlepiej scharakteryzować związki referencyjne oraz zweryfikować ich potencjał do aktywacji receptora TrkB, postanowiono sprawdzić, czy związki drobnocząsteczkowe są w stanie indukować dimeryzację TrkB–podobnie jak BDNF. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem domeny

zewnątrzkomórkowej TrkB, którą inkubowano z badanymi ligandami a następnie rozdzielono w warunkach natywnych. Wykazano brak zdolności związków małowcząsteczkowych do indukowania dimeryzacji exTrkB. Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że badane związki nie powodują również dimeryzacji receptora o pełnej długości (TrkB-FL). Należy pamiętać, że istnieją różnice w globalnej strukturze pomiędzy receptorem TrkB o pełnej długości a samą domeną zewnątrzkomórkowa użytą w doświadczeniach (exTrkB), co mogło być powodem otrzymania takiego wyniku. Niemniej jednak udowodniono, że ligandy receptorów kinaz tyrozynowych nie powodują reorganizacji struktury receptora na całej jego długości. Sekwencje linkerowe pomiędzy poszczególnymi domenami są sztywne i nieustrukturyzowane, dzięki czemu domeny ICD i ECD mogą zmieniać konformacje w sposób niezależny [107,108]. Wprawdzie wykazano, że pozakomórkowy motyw przybłonowy (EJM) w strukturze TrkB utrudnia tworzenie dimeru [226], co w przypadku użytego tu exTrkB nie mogło mieć miejsca, gdyż rekombinowane białko jest pozbawione tej sekwencji. Także obecność form heterodimerskich TrkB-FL/TrkB-T1 w błonie komórkowej neuronów sugeruje, że dimeryzacja może zachodzić nawet wtedy, gdy monomery nie współdzielą 100% homologii w sekwencji aminokwasowej [84,85,227]. Widać zatem, że badanie właściwości ligandów do indukowania dimeryzacji jedynie zewnątrzkomórkowej domeny TrkB jest możliwe i uzasadnione. Otrzymany wynik dla BDNF wspiera zastosowane podejście, ponieważ wykazano jego zdolność do dimeryzacji exTrkB. W świetle zaprezentowanych wyników, można zatem powiedzieć, że związki referencyjne (7,8,3-THF, 4'-DMA-7,8-DHF, GSB-106, LM22-A4, HIOC, NAS, izokumaryna oraz NSI-189) nie naśladują funkcji BDNF i nie są agonistami TrkB, ponieważ nie powodują jego dimeryzacji. Ponadto, jak już wcześniej wspomniano badane związki nie powodowały także ortosterycznej aktywacji TrkB. Dalsze wyniki wspierają to odkrycie. Komórki linii SN56 T48 nie odpowiadają na stymulację wspomnianymi związkami referencyjnymi, oraz nie zaobserwowano pobudzenia ścieżek sygnałowych związanych z fosforylacją PLC γ 1, ERK1/2 i Akt w tych komórkach. Otrzymane wyniki są spójne z obserwacjami Todd i wsp., (2014) oraz Boltaev i wsp., (2017) [199,200]. Autorzy wykazali brak aktywności, opisanych wcześniej, związków małowcząsteczkowych *in vitro* w modelach komórkowych U2OS (PathHunter Assays DiscoverX), CHO K1 (Cell Sensor, Life Technologies) i pierwotnych komórkach neuronalnych. Dane te wskazują na brak aktywności związków względem receptora TrkB. Przynieszone tu

wyniki pozwalają poddać pod wątpliwość zasadność stosowania wspomnianych tu związków jako referencyjnych agonistów TrkB.

Ciekawą obserwację stanowią wyniki otrzymane dla związków DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113. Pomimo wykazanej efektywności cząsteczek w teście na aktywność ortosteryczną, nie powodują one dimeryzacji fragmentu receptora, exTrkB. Pozwala to przypuszczać, że związki mogą aktywować TrkB alternatywnie, inaczej niż określa to kanoniczny mechanizm aktywacji TrkB. Najnowsze doniesienia nie wykluczają możliwości istnienia równoległych, niezależnych od dimeryzacji TrkB mechanizmów prowadzących do aktywacji receptora i zależnej od niego kaskady sygnałowej [111]. Postulowany tryb działania zakłada, że BDNF jest w stanie aktywować prezentowane na błonie plazmatycznej monomery receptora TrkB. W wyniku tej interakcji dalsza transdukcja sygnału może zachodzić dwutorowo. Po pierwsze, aktywny monomer TrkB związany z BDNF bezpośrednio aktywuje ścieżkę sygnałową ERK1/2. Po drugie, kompleks monomer TrkB-BDNF ulega endocytozie z udziałem dyneiny i zostaje upakowany w endosomach. Po osiągnięciu stanu wysycenia w przestrzeni endosomalnej dochodzi do dimeryzacji TrkB i gwałtownej aktywacji szlaku komórkowego PI3K-Akt [111]. Widać zatem, że w zależności od tego czy aktywacji ulega monomer czy dimer TrkB, BDNF może równocześnie bądź preferencyjnie indukować sygnalizację komórkową ERK1/2 bądź Akt. Autorzy postulują, że takie subkomórkowe zmiany przestrzenne w organizacji receptora mogą regulować specyficzną aktywność sygnalizacyjną BDNF, przystosowując amplitudę, czas trwania sygnalizacji oraz lokalizację w komórce [111]. Należy jednak podkreślić, że nie wiadomo, czy mechanizm ten jest uniwersalny dla wszystkich typów komórek. Niemniej jednak, konfrontując te obserwacje z wynikami uzyskanymi dla DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113, które pokazują, że związki powodują fosforylację TrkB, ale nie indukują dimeryzacji exTrkB, wysunięto hipotezę, że wspomniany powyżej model aktywacji monomerów TrkB może stanowić mechanizm działania w przypadku wymienionych związków małowcząsteczkowych.

W związku z czym, w przedstawionej pracy sprawdzono, czy komórki SN56 T48 specyficznie odpowiedzą na stymulację związkami i selektywnie uruchomią wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe PLC γ 1, Akt i ERK1/2. Zaobserwowano, iż związki małowcząsteczkowe w zależności od stężenia indukują fosforylację receptora TrkB oraz wpływają na wzrost fosforylacji białek PLC γ 1, Akt i ERK1/2 jednocześnie. Nie

zaobserwowano selektywnej aktywacji ścieżek sygnałowych ERK1/2 bądź Akt1 po 15 minutach podania, co mogłoby potwierdzić postulowany mechanizm działania dla DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113. Co więcej, odpowiedź komórek SN56 T48 na stymulację wspomnianymi związkami wydaje się być niespecyficzna i niezwiązana jedynie z aktywnością TrkB. Zastosowanie inhibitora K252a jedynie nieznacznie wpłynęło wyciszająco na fosforylację białek sygnałowych, odwrotnie niż miało to miejsce w przypadku gdy komórkom podano równocześnie BDNF. Brak specyficzności działania związków potwierdzono w analogicznych eksperymentach, do których wykorzystano zróżnicowane i niezróżnicowane komórki SH-SY5Y. Nie odnaleziono w piśmiennictwie informacji dotyczących aktywności *in vitro* dla CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113 (nazwy systematyczne związków zawarte w Tabeli 5). Szczątkowe dane literaturowe odnoszą się jedynie do aktywności związku DMAQ-B1, i są one spójne z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy. Wykazano, że DMAQ-B1 nieselektywnie aktywuje receptory o aktywności kinazy tyrozynowej. W stężeniach mikromolarnych, poza receptorem TrkB związek wykazuje aktywność względem receptora insulinowego, TrkA oraz TrkC [197,228]. Należy też dodać, że efektywność DMAQ-B1 została zaobserwowana w naiwnych komórkach linii CHO (komórki jajnika chomika chińskiego), w których związek powodował aktywację ścieżek sygnałowych MAPK i PI3K na drodze niezależnej od receptorów Trk [197]. Komórki CHO wykazują stosunkowo niewielki poziom ekspresji receptorów insulinowych, a sama insulina oraz jej receptor pozostają bez bezpośredniego wpływu na aktywność Trk [197,229]. Widać zatem, że aktywność DMAQ-B1 nie ogranicza się jedynie tylko do wspomnianych tu receptorów. Zarówno wyniki niniejszej pracy jak i przytoczone badania pozwalają twierdzić, że DMAQ-B1 wykazuje niską specyficzność, a pobudzenie wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych jest wynikiem interakcji związku także z celami molekularnymi innymi niż TrkB.

Obok funkcji regulujących wzrost i dojrzewanie neuronów, BDNF wykazuje także właściwości cytoprotekcyjne. Pozytywny wpływ BDNF na przeżywalność komórek został udowodniony dla wielu populacji neuronów i typów komórek narażonych na zróżnicowane bodźce stresowe i neurotoksyny [60,230,231]. Idąc śladem fizjologicznych funkcji BDNF, związki małowcząsteczkowe będące agonistami TrkB powinny także wykazywać funkcje protekcyjne. Mimo iż w niniejszej pracy wykazano, że profil aktywności wyselekcjonowanych związków chemicznych nie spełnia kryteriów dla selektywnych

agonistów TrkB, postanowiono jednak eksperymentalnie zweryfikować, czy związki opisane w literaturze jako agoniści TrkB, naśladują funkcjonalne efekty BDNF.

Do badania właściwości cytoprotekcyjnych cząsteczek zaadaptowano model zróżnicowanych komórek SH-SY5Y, w których indukowano apoptozę z użyciem neurotoksyny MPP⁺. Mechanizm cytotoksyczności MPP⁺ polega na inhibicji kompleksu I łańcucha oddechowego w mitochondriach neuronów, co prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu i obniżenia poziomu ATP [232]. Długotrwała ekspozycja na neurotoksynę i zainicjowany przez nią stres oksydacyjny powodują wzrost markerów apoptotycznych w komórkach neuronalnych co doprowadza do ich śmierci [233,234]. Także w zróżnicowanych komórkach SH-SY5Y, które stanowią model komórek neuronalnych, odnotowano bardzo duży spadek populacji żywych komórek po upływie 72 h inkubacji z 0,5 mM MPP⁺ co potwierdza słuszność zastosowania tego modelu do oceny właściwości cytoprotekcyjnych związków [201,208]. Jak się spodziewano, BDNF zahamował efekt cytotoksyczny MPP⁺. W pracy wykazano, że wstępna stymulacja BDNF koreluje ze zwiększoną przeżywalnością komórek po zaindukowaniu apoptozy neurotoksyną. Otrzymane wyniki są spójne z danymi literaturowymi mówiącymi o ochronnych właściwościach BDNF w stosunku do różnicowanych komórek SH-SY5Y traktowanych neurotoksyną MPP⁺ [201]. Nie zaobserwowano natomiast efektu cytoprotekcyjnego dla żadnych z przetestowanych związków małowcząsteczkowych. Cytoprotekcyjny mechanizm BDNF jest bezpośrednio związany z aktywacją ścieżek sygnałowych, PI3K/Akt oraz MAPK/MEK [201,235]. Aktywne białko Akt odpowiada za sekwestrację i neutralizację proapoptotycznego białka Bad, co utrudnia utworzenie apoptosomu [66,235]. Wiadomo też, że ufosforylowane białka Akt, ERK1/2 oraz PLCγ1 uruchamiają ekspresję licznych genów, które przyczyniają się do przeżycia komórek w warunkach stresowych [66,119]. Analizy Western blot na zróżnicowanych komórkach SH-SY5Y wykazały wzrost fosforylacji ścieżek sygnałowych wpływających na cytoprotekcję po zastosowaniu BDNF oraz DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113. Jak już wspomniano, związki małowcząsteczkowe nie wykazywały efektu cytoprotekcyjnego w modelu zróżnicowanych SH-SY5Y i MPP⁺. Zastosowane dawki związków w obu eksperymentach różnią się, z uwagi na rozciągnięty w czasie eksperyment badający cytoprotekcję, co może tłumaczyć brak obserwowanej efektywności związków. Niemniej jednak, co bardziej prawdopodobne, DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113 nie wykazują właściwości

cytoprotekcyjnych, gdyż jak już omówiono wcześniej – efekt pobudzenia ścieżek sygnałowych wynika z niespecyficznego mechanizmu działania związków, co może tłumaczyć obserwowany efekt. Powyższe wnioski wspierają dostępne opublikowane dane, które pokazują że DMAQ-B1 –, w stężeniach mikromolarnych, powoduje cytotoksyczność w pierwotnych neuronach korowych oraz komórkach linii CHO, czyli wykazuje działanie przeciwne niż to dyskutowane tutaj [197,200].

Do małowcząsteczkowych związków chemicznych, identyfikowanych jako agonista receptora TrkB, należy także 7,8-dihydroksyflawon. Jest to wiodący związek referencyjny pośród małowcząsteczkowych agonistów TrkB, będący przedmiotem badań ponad 270 prac naukowych zdeponowanych w bazie PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>; stan na maj 2022). Liczne doniesienia naukowe wskazujące na zależne od TrkB terapeutyczne właściwości cząsteczki, stanowiły fundament i punkt wyjścia do poszukiwania innowacyjnych agonistów TrkB, czego podjęto się w niniejszej pracy. Jak wspomniano wcześniej, badania nad rozwojem potencjalnych kandydatów na lek zakończono już na etapie funkcjonalnych testów *in vitro*, gdyż nie udało się zidentyfikować innowacyjnej molekuly o pożądanej aktywności ortosterycznej wobec TrkB. Dalsze badania i otrzymywane dane eksperymentalne kontrastowały z przyjętym w literaturze imperatywem o ortosterycznej aktywności 7,8-DHF względem TrkB i potwierdzały obserwacje zaraportowane przez dwa inne zespoły badawcze, które również sugerują że aktywność małowcząsteczkowych agonistów TrkB względem celu molekularnego nie jest bezdyskusyjna [199,200]. Wykazano wówczas, że 7,8-DHF jest pozbawiony aktywności ortosterycznej TrkB w warunkach *in vitro* [199,200]. Widać zatem, że pierwotne i utrwalane w piśmiennictwie postulaty dotyczące relacji 7,8-DHF z receptorem TrkB w świetle powyższych obserwacji wymagają konfrontacji oraz ponownej ewaluacji. Potrzebę poznania farmakologii 7,8-DHF uzasadnia również sam fakt, iż związek wykazuje potencjał terapeutyczny, a to skupia zainteresowanie wielu środowisk naukowych i stwarza możliwość aplikacji medycznej. Dlatego też, kolejnym zagadnieniem podjętym w niniejszej pracy była kompleksowa i wielopoziomowa charakterystyka 7,8-DHF. W przeprowadzonych analizach badano interakcję 7,8-DHF z TrkB oraz aktywność funkcjonalną w modelach *in vitro*. Scharakteryzowano jego właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne oraz selektywność, a otrzymane wyniki skonfrontowano z opublikowanymi dotąd danymi.

Z wykorzystaniem metody termoforezy mikroskalowej potwierdzono, że 7,8-DHF wiąże się z domeną exTrkB i wykazuje powinowactwo wiązania na poziomie 1,3 μM . W badaniach Jang i wsp., (2010b) oraz Liu i wsp., (2014) autorzy opisują powinowactwo wiązania 7,8-DHF w zakresie nanomolowym (wynoszącym odpowiednio 15,5 i 12,1 nM). Różnice w powinowactwie wiązania wydają się wynikać z zastosowania różnych metod, ponieważ wartości K_d dla BDNF określone techniką MST były również wyższe niż te uzyskane metodą SPR (powierzchniowy rezonans plazmonów; ang. *surface plasmon resonance*) i wynosiły odpowiednio 93 i 1,7 nM [176,236]. Ponadto, w badaniach Jang i wsp., (2010b) przy użyciu testu ściągania (ang. *pull down assay*) wykazano zdolność 7,8-DHF do indukowania dimeryzacji zewnątrzkomórkowej domeny TrkB [176]. W niniejszej pracy zastosowano metodę elektroforezy natywnej, aby potwierdzić zdolność 7,8-DHF do dimeryzacji receptora exTrkB. Niemniej jednak nie zaobserwowano oczekiwanego efektu dimeryzacji dla badanego związku.

Prace źródłowe pokazują, że 7,8-DHF jest w stanie indukować autofosforylację TrkB, co z kolei prowadzi do aktywacji kaskady sygnałowej i fosforylacji białek Akt1 i ERK1/2 w linii komórkowej SN56 T48 i neuronach pierwotnych [176,182]. Wyniki mojej pracy wskazują, że aktywacja receptora TrkB przez 7,8-DHF w linii komórkowej SN56 T48 nie zachodzi, ani w trybie ortosterycznym, ani allosterycznym. Analizy z wykorzystaniem techniki Western blot potwierdzają również brak wpływu 7,8-DHF na aktywność białek efektorowych w komórkach linii SN56 T48 oraz zróżnicowanej SH-SY5Y. Powyższe obserwacje potwierdzają wyniki uzyskane przez Boltayeva i in. (2017) oraz Todd i in. (2014), którzy nie zaobserwowali aktywności 7,8-DHF względem TrkB w innych modelach komórkowych *in vitro*– DiscoverX U2OS, PathHunter Assays oraz pierwotnych komórkach neuronalnych [199,200].

W dalszych testach funkcjonalnych, w których oceniano właściwości cytoprotekcyjne 7,8-DHF, również nie udowodniono efektywności związku. Jak wspomniano wcześniej, efekt cytoprotekcyjny wobec różnicowanych komórek SH-SY5Y w których indukowano toksyczność wykazano jedynie dla BDNF. Kilka grup badawczych wykazało, że 7,8-DHF ma właściwości cytoprotekcyjne w różnych modelach indukowanej cytotoxyczności *in vitro*: 6-OHDA i MPP⁺ w komórkach PC-12 (linia komórkowa wyprowadzona z przeszczepowego szczurzego ogniska chromochłonnego), oraz glutaminianu w linii komórkowej mysich unieśmiertelnianych neuronów hipokampalnych HT-22 [237–239]. W

przytoczonych pracach, 7,8-DHF chronił komórki przed apoptozą w szerokim zakresie dawek (0,1–25 μM). Doświadczenia te nie były jednak przeprowadzone na zróżnicowanych komórkach SH-SY5Y, w których TrkB ulega nadekspresji, co może tłumaczyć obserwowane różnice. We wspomnianych badaniach cytoprotekcyjne działanie 7,8-DHF było skorelowane ze zwiększoną aktywnością oksygenazy hemowej 1 (HO-1) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz inhibicją sygnalizacji szlaku JNK (kinaza domeny N-końcowej białka Jun; ang. *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) w komórkach PC-12, oraz zwiększonym poziomem glutationu w komórkach linii HT-22. Może to wskazywać na specyficzny dla linii komórkowej i niezależny od TrkB mechanizm działania, w którym 7,8-DHF osiąga swój efekt cytoprotekcyjny.

Aby móc ostatecznie potwierdzić rolę receptora TrkB jako głównego mediatora efektywności, 7,8-DHF przeprowadzono łączone badanie farmakokinetyczne i farmakodynamiczne na myszach. Pierwsze wzmianki literaturowe wskazują na zadowalającą biodostępność 7,8-DHF i jego zdolność do penetracji bariery krew-mózg i wywierania efektu farmakologicznego. W badaniach przeprowadzonych przez Jang i wsp. (2010) związek 7,8-DHF wykazywał działanie funkcjonalne na drodze zależnej od TrkB, zarówno po ostrym (5 mg/kg dla myszy knock-in TrkB F616A) jak i subchronicznym podaniu związku (myszom szczepu C57BL/6 w wodzie pitnej w dawce 5 mg/kg przez 14 dni) [179]. Jednak dalsze badania na myszach szczepu C57BL/6, CD1 i 5xFAD wykazały niekorzystne właściwości farmakokinetyczne 7,8-DHF. Dowiedziono wówczas, że związek co prawda jest biodostępny po podaniu doustnym, jednakże wykazuje on niską dostępność dla organizmu, ponieważ osiąga niskie wartości ekspozycji pomimo podania dużych dawek 7,8-DHF [183,240]. W opisanym w pracy badaniu farmakokinetycznym 7,8-DHF został podany myszom BALB/c drogą doustną oraz dożylną. 7,8-DHF nie został wykryty w osoczu i mózgu myszy po podaniu 1 mg/kg *i.v.*, co sugeruje bardzo szybki proces eliminacji związku. Najprawdopodobniej proces ten zachodzi niezależnie od metabolizmu mikrosomów pierwszej fazy, o czym szerzej dyskutowano w pracy Pankiewicz i wsp., (2021) [241]. 7,8-DHF był wykrywalny w osoczu po podaniu doustnym (50 mg/kg), w którym osiągał stężenie 72,42 ng/mL. Stężenie 7,8-DHF w mózgu określono jako 10-krotnie niższe niż w osoczu ($C_{\text{max}} = 6,35 \text{ ng/g}$), jednakże nie u wszystkich osobników wykryto związek w mózgu. Zgodnie z danymi literaturowymi, O-metylowane metabolity 7,8-DHF mogą być częściowo odpowiedzialne za działanie farmakologiczne, ponieważ

aktywują one receptor TrkB (Liu i in., 2013). W moim badaniu metabolity 7,8-DHF: 7-hydroksy-8-metoksyflawon oraz 8-hydroksy-7-metoksyflawon były wykrywane w osoczu osiągając stężenie maksymalne 34,64 ng/mL po podaniu doustnym, jednakże nie wykryto ich w mózgu.

Dalsze analizy farmakodynamiczne z zastosowaniem techniki Western blot wykazały brak wpływu 7,8-DHF na aktywację TrkB (Tyr706) oraz fosforylację białek sygnałowych PLC γ 1, Akt i ERK1/2 w próbkach hipokampa i kory czołowej myszy, w czasie 30 min i 2 godziny od podania związku. Należy zaznaczyć, że w niniejszym badaniu stężenie 7,8-DHF w mózgach myszy BALB/c po podaniu doustnym było niższe niż wartości osiągnięte w innych badaniach i szczepach myszy [183,240]. Z tego powodu nie można jednoznacznie stwierdzić, czy brak obserwowanego efektu farmakodynamicznego jest spowodowany niewystarczającą aktywnością 7,8-DHF wobec TrkB, czy też dlatego, że stężenie związku macierzystego i metabolitów było niewystarczające do pobudzenia receptora TrkB i związanych z nim ścieżek sygnałowych w mózgu myszy.

Ponieważ, pod wpływem 7,8-DHF, nie zaobserwowano aktywacji receptora TrkB i ścieżek sygnałowych *in vitro* i *ex vivo*, dimeryzacji exTrkB ani efektów funkcjonalnych, zdecydowano się ocenić profil selektywności 7,8-DHF. Zlecone badania w ramach panelu BioPrint® wykazały, że 7,8-DHF jest w stanie wiązać się z wieloma celami molekularnymi, do których należą: receptory A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃, BZD, MT3 i 5-HT_{2B} oraz białka COX2, MMP-2, MMP-9, kinaza Lyn A i oksydaza ksantynowa. Interakcja z większością wymienionych tu celów molekularnych może wpływać na aktywność ścieżek sygnałowych zaangażowanych w choroby neuropsychiatryczne. W szczególności oddziaływanie z A_{1A}, A_{2A}, BZD lub COX-2 może wyjaśniać opisane w literaturze pozytywne efekty behawioralne powodowane przez 7,8-DHF [211,242–245]. Związki chemiczne modulujące szlak adenozynowy, w zależności od podtypu receptora, mogą przynosić korzystne efekty w terapii niektórych zaburzeń OUN, w tym np. epilepsji, bólu i niedokrwieniu mózgu. Receptory A_{1A} zmniejszają transmisję pobudzających neurotransmiterów poprzez regulację homeostazy potasu, co prowadzi do zahamowania wydzielania glutaminianu w komórkach neuronalnych. Natomiast receptor A_{2A} moduluje wrażliwość receptorów dopaminowych D2, głównie w neuronach prążkowania, co wpływa na funkcje psychomotoryczne [242]. Udowodniono klinicznie, że interakcja receptora GABA_A wywołuje działanie przeciwlękowe i przeciwdepresyjne poprzez odwracanie deficytów w

neurotransmisji monoamin w szlakach GABAergicznym [243]. Zahamowanie COX-2 przez celekoksyb, znany niesteroidowy lek przeciwzapalny, odwraca deficyty behawioralne wywołane przewlekłym nieprzewidywalnym stresem u szczurów. Ponadto inhibicja COX-2 z udziałem celekoksylu wykazała skuteczność w badaniach klinicznych z udziałem pacjentów z depresją, co korelowało z działaniem przeciwzapalnym [244,246,247]. Niska selektywność 7,8-DHF wskazuje, że aktywność farmakologiczna obserwowana w licznych badaniach *in vivo* może wynikać z wielocelowego mechanizmu działania tej cząsteczki. Tak więc, w świetle powyższych odkryć, interpretacja dotychczasowych wyników badań powinna być możliwie jak najbardziej ostrożna i wymaga szerszego kontekstu, ponieważ efekt farmakologiczny 7,8-DHF może zależeć od interakcji z co najmniej kilkoma celami molekularnymi.

Podsumowując przytoczone w rozprawie wyniki badań, należałoby się zastanowić, czy ortosteryczne miejsce wiązania receptora TrkB stanowi właściwy z punktu widzenia chemii medycznej farmakofor do poszukiwania potencjalnych leków. Podjęte próby identyfikacji aktywnych agonistów TrkB, zarówno z puli biblioteki związków jak i opisanych w literaturze molekuł nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. W toku prowadzonych badań wielokrotnie wskazano na ograniczenia związków małowcząsteczkowych jako selektywnych agonistów TrkB, zarówno na poziomie interakcji z receptorem jak i efektów funkcjonalnych. Należy się zgodzić, że aktywność 7,8-DHF została wykazana w wielu badaniach przedklinicznych. Jednak do tej pory nie zgłoszono żadnych badań klinicznych oceniających aktywność farmakologiczną 7,8-DHF u ludzi (na podstawie www.clinicaltrials.gov, stan na maj 2022 r). Pomimo kompleksowych analiz przeprowadzonych w tej pracy, nadal trudno jest jednoznacznie zidentyfikować mechanizmy, dzięki którym 7,8-DHF osiąga efekty biologiczne. Jak pokazują wyniki, aktywność *in vivo* 7,8-DHF nie jest spowodowana bezpośrednią aktywacją TrkB, ale można ją przypisać innym celom molekularnym, potencjalnie aktywowanym przez cząsteczkę lub także przez jej metabolity. W związku z powyższym, zarówno 7,8-DHF jak i pozostałe związki chemiczne, w przyszłych badaniach naukowych, powinny być ostrożnie traktowane i stosowane jako związki referencyjne w kontekście agonistów TrkB oraz naśladujące funkcje BDNF.

Opracowana na potrzeby realizacji pracy doktorskiej platforma badawcza umożliwia selekcje oraz charakterystykę związków małowcząsteczkowych jako agonistów TrkB, pozwalając na ich dalszy rozwój przedkliniczny. Niemniej jednak, warto zwrócić uwagę, że

wykorzystane w niniejszej pracy metody badawcze również mają pewne ograniczenia. Co prawda zastosowanie metody MST pozwoliło na wstępną selekcję związków i uszeregowanie ich pod względem wartości K_d , jednakże na tym etapie nie było możliwe sprecyzowanie czy oddziaływanie zachodzi w odpowiednim miejscu w receptorze exTrkB, co rzutowało na uzyskanie sporej populacji wyników fałszywie dodatnich. Z kolei wykorzystany w badaniach *in vitro* model komórkowy mysiej hybrydomy komórek neuronalnych przegrody i neuroblastomy (SN56) oraz zróżnicowanej linii komórkowej SH-SY5Y stanowi „sztuczny” model, w których białko TrkB ulega nadprodukcji. Zastosowane modele pozwoliły na charakterystykę związków pod względem ich aktywności ortosterycznej bądź jako allosterycznych modulatorów TrkB. Ponadto, określono efekty funkcjonalne związków i porównano je z właściwościami BDNF. Niemniej jednak, należy zaznaczyć, że zastosowane modele nie odzwierciedlają w pełni warunków fizjologicznych, czy chociażby tych, które zachodzą w pierwotnych hodowlach neuronalnych, u których TrkB ulega naturalnej ekspresji- a to - mogło wpłynąć na otrzymane wyniki. Idąc dalej, określenie właściwości farmakologicznych na zwierzętach 7,8-DHF zostało przeprowadzone tylko na jednym gatunku oraz szczepie- myszach BALB/c. W związku z czym, właściwości farmakokinetyczne/farmakodynamiczne mogły zostać nieprawidłowo oszacowane z uwagi na zmienność międzygatunkową.

Zaprezentowane wyniki własnych badań oraz dane literaturowe potwierdzają istniejącą opinię, że receptor TrkB nie jest „łatwym” celem do opracowywania małowcząsteczkowych agonistów. Stworzenie biodostępnego związku, który byłby ortosterycznym agonistą TrkB i jednocześnie naśladował efekty BDNF wydaje się być sporym wyzwaniem, chociażby z uwagi na różnice pomiędzy masą molekularną tych cząsteczek. Zgodnie z regułą Lipińskiego, związek charakteryzuje się zadowalającą biodostępnością systemową m.in. wtedy, gdy jego masa cząsteczkowa nie przekracza 500 Da [163]. Funkcjonalna, dimeryczna forma BDNF osiąga masę 28 kDa. Widać zatem jak spore są dysproporcje pomiędzy agonistą białkowym a małowcząsteczkowym, co może być jedną z przyczyn niepowodzeń przy opracowywaniu aktywnych małowcząsteczkowych agonistów TrkB. W oparciu o najnowsze odkrycia, allosteryczna modulacja TrkB oferuje nowe możliwości rozwoju potencjalnych leków [224]. Przyszłe badania i próby projektowania nowych związków chemicznych oddziałujących z TrkB powinny wykorzystać postulowane miejsce wiązania niektórych antydepresantów do skrzyżowanej domeny transbłonowej TrkB

[224]. Wspomniana kieszeń wiążąca stanowi obecnie proponowany farmakofor dla cząsteczek celujących w szlak BDNF-TrkB. Warto podkreślić, że zastosowana w niniejszej pracy metodologia badawcza opracowana w ramach tzw. platformy badań przesiewowych może zostać z powodzeniem wykorzystana do charakterystyki związków w kolejnych kampaniach związanych z rozwojem kandydatów na lek.

6. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- i. Opracowano platformę do badań przesiewowych i charakterystyki funkcjonalnej cząsteczek oddziałujących z TrkB i potwierdzono jej funkcjonalność poprzez zastosowanie BDNF. Platformę można wykorzystać w przyszłych projektach badawczych i poszukiwaniach związków aktywujących TrkB.
- ii. Znacząca większość związków małowcząsteczkowych opisanych w literaturze jako agoniści receptora TrkB nie wykazuje właściwości ortosterycznych ligandów TrkB (brak interakcji z receptorem oraz funkcjonalnej aktywności *in vitro*).
- iii. Spośród biblioteki 987 związków chemicznych, na drodze badań przesiewowych nie zidentyfikowano innowacyjnej cząsteczki, która jednocześnie wiązałaby się z TrkB i powodowała jego aktywację *in vitro*.
- iv. Związki małowcząsteczkowe: DMAQ-B1, LM22A-4, LM22B-10, HIOC, 7,8-dihydroksyflawon, NSI-189, OSSK-495385, NAS, 7,8,3'-THF, 4'-DMA-7,8-DHF, GSB-106, izokumaryna CPL503052, CPL503071, CPL503113 nie pełnią funkcji allosterycznych modulatorów receptora TrkB w modelu linii komórkowej SN56 T48.
- v. Związki DMAQ-B1, CPL503071 oraz CPL503113 jako jedyne aktywują receptor TrkB *in vitro*, równocześnie wykazując niespecyficzny mechanizm aktywacji ścieżek sygnałowych PLC γ 1, Akt, ERK1/2, co nie przekłada się na właściwości cytoprotekcyjne związków.
- vi. 7,8-DHF nie wykazuje aktywności agonisty TrkB w modelach *in vitro* SN56T48 oraz zróżnicowanej SH-SY5Y.
- vii. Brak obserwowanej aktywności TrkB i ścieżek sygnałowych w strukturach mózgu myszy po podaniu 7,8 DHF może być związane z niekorzystnym profilem farmakokinetycznym tej cząsteczki u myszy u myszy.
- viii. 7,8-DHF wykazuje niską selektywność i oddziałuje z co najmniej dwunastoma celami molekularnymi.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Kanter JW, Busch AM, Weeks CE, Landes SJ. The nature of clinical depression: Symptoms, syndromes, and behavior analysis [Internet]. T. 31, Behavior Analyst. Association for Behavior Analysis; 2008 [cytowane 17 maj 2021]. s. 1–21. Dostępne na: </pmc/articles/PMC2395346/>
2. Cooper JA, Arulpragasam AR, Treadway MT. Anhedonia in depression: biological mechanisms and computational models [Internet]. T. 22, Current Opinion in Behavioral Sciences. Elsevier Ltd; 2018 [cytowane 5 sierpień 2021]. s. 128–35. Dostępne na: </pmc/articles/PMC5828520/>
3. Liu Q, He H, Yang J, Feng X, Zhao F, Lyu J. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study. *J Psychiatr Res*. 1 lipiec 2020;126:134–40.
4. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, i in. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* [Internet]. 17 październik 2020 [cytowane 3 lipiec 2021];396(10258):1204–22. Dostępne na: <http://ghdx.healthdata.org/gbd->
5. Lader M. Limitations of current medical treatments for depression: Disturbed circadian rhythms as a possible therapeutic target. T. 17, *European Neuropsychopharmacology*. Elsevier; 2007. s. 743–55.
6. Nakajima S, Suzuki T, Watanabe K, Kashima H, Uchida H. Accelerating response to antidepressant treatment in depression: A review and clinical suggestions. T. 34, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier; 2010. s. 259–64.
7. Greenberg PE, Fournier AA, Sisitsky T, Simes M, Berman R, Koenigsberg SH, i in. The Economic Burden of Adults with Major Depressive Disorder in the United States (2010 and 2018). *Pharmacoeconomics* [Internet]. 1 czerwiec 2021 [cytowane 3 lipiec 2021];39(6):653–65. Dostępne na: <https://doi.org/10.1007/s40273-021-01019-4>
8. Dwivedi Y. Brain-derived neurotrophic factor: Role in depression and suicide [Internet]. T. 5, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. DOVE Medical Press Ltd.; 2009 [cytowane 17 maj 2021]. s. 433–49. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19721723/>
9. Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders [Internet]. T. 64, *Pharmacological Reviews*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics; 2012 [cytowane 2 sierpień 2021]. s. 238–58. Dostępne na: </pmc/articles/PMC3310485/>
10. Miranda-Lourenço C, Ribeiro-Rodrigues L, Fonseca-Gomes J, Tanqueiro SR, Belo RF, Ferreira CB, i in. Challenges of BDNF-based therapies: From common to rare diseases. *Pharmacol Res* [Internet]. 1 grudzień 2020 [cytowane 9 lipiec

2021];162:105281. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661820315899>

11. Dai L, Zhou H, Xu X, Zuo Z. Brain structural and functional changes in patients with major depressive disorder: A literature review. *PeerJ* [Internet]. 2019 [cytowane 5 sierpień 2021];2019(11). Dostępne na: [/pmc/articles/PMC6886485/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26983772/)

12. Monkul ES, Malhi GS, Soares JC. Mood disorders - Review of structural MRI studies [Internet]. T. 15, *Acta Neuropsychiatrica*. Blackwell Publishing Ltd; 2003 [cytowane 5 sierpień 2021]. s. 368–80. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26983772/>

13. Zhang FF, Peng W, Sweeney JA, Jia ZY, Gong QY. Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence [Internet]. T. 24, *CNS Neuroscience and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd; 2018 [cytowane 5 sierpień 2021]. s. 994–1003. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC6489983/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26983772/)

14. Dawood T, Anderson J, Barton D, Lambert E, Esler M, Hotchkin E, i in. Reduced overflow of BDNF from the brain is linked with suicide risk in depressive illness [4] [Internet]. T. 12, *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2007 [cytowane 5 sierpień 2021]. s. 981–3. Dostępne na: <http://www.nature.com/mp>

15. Groves JO. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? [Internet]. T. 12, *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2007 [cytowane 5 sierpień 2021]. s. 1079–88. Dostępne na: www.nature.com/mp

16. Yu H, Chen ZY. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry [Internet]. T. 32, *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group; 2011 [cytowane 5 sierpień 2021]. s. 3–11. Dostępne na: www.chinaphar.com

17. Monteggia LM, Björkholm C. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*. 2017;102:72–9.

18. Arumugam V, John V, Augustine N, Jacob T, Joy S, Sen S, i in. The impact of antidepressant treatment on brain-derived neurotrophic factor level: An evidence-based approach through systematic review and meta-analysis. *Indian J Pharmacol* [Internet]. 1 maj 2017 [cytowane 5 sierpień 2021];49(3):236–42. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC5637134/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26983772/)

19. Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res* [Internet]. maj 2006 [cytowane 14 wrzesień 2021];55(1):1–10. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16516994/>

20. Pradhan J, Noakes PG, Bellingham MC. The Role of Altered BDNF/TrkB Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis [Internet]. T. 13, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2019 [cytowane 14 wrzesień 2021]. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC6700252/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26983772/)

21. Siegel GJ, Chauhan NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain [Internet]. T. 33, *Brain Research Reviews*. *Brain Res Brain Res Rev*; 2000

[cytowane 14 wrzesień 2021]. s. 199–227. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11011066/>

22. Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Mol Brain Res* [Internet]. 1996 [cytowane 9 lipiec 2021];36(2):280–6. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8965648/>

23. Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, Graham SL. TrkB receptor signalling: Implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):10122–42.

24. Morse JK, Wiegand SJ, Anderson K, You Y, Cai N, Carnahan J, i in. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents the degeneration of medial septal cholinergic neurons following fimbria transection. *J Neurosci* [Internet]. 1993 [cytowane 14 wrzesień 2021];13(10):4146–56. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8080477/>

25. Habtemariam S. The brain-derived neurotrophic factor in neuronal plasticity and neuroregeneration: New pharmacological concepts for old and new drugs [Internet]. T. 13, *Neural Regeneration Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2018 [cytowane 26 maj 2021]. s. 983–4. Dostępne na: </pmc/articles/PMC6022464/>

26. Zuccato C, Marullo M, Vitali B, Tarditi A, Mariotti C, Valenza M, i in. Brain-derived neurotrophic factor in patients with Huntington's disease. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cytowane 14 wrzesień 2021];6(8). Dostępne na: </pmc/articles/PMC3155522/>

27. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* [Internet]. 1 maj 1982 [cytowane 8 maj 2021];1(5):549–53. Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x>

28. Tettamanti G, Cattaneo AG, Gornati R, de Eguileor M, Bernardini G, Binelli G. Phylogenesis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in vertebrates. *Gene*. 15 stycznia 2010;450(1–2):85–93.

29. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* [Internet]. 1990 [cytowane 8 maj 2021];9(8):2459–64. Dostępne na: </pmc/articles/PMC552273/?report=abstract>

30. Pöyhönen S, Er S, Domanskyi A, Airavaara M. Effects of neurotrophic factors in glial cells in the central nervous system: Expression and properties in neurodegeneration and injury. T. 10, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2019. s. 486.

31. Wang L, Chang X, She L, Xu D, Huang W, Poo MM. Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J Neurosci* [Internet]. 3 czerwiec 2015 [cytowane 15 wrzesień 2021];35(22):8384–93. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26041908/>

32. Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, i in. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous

- system. *Neuroscience* [Internet]. 10 marzec 1997 [cytowane 6 maj 2021];78(2):431–48. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9145800/>
33. Zhang HT, Li LY, Zou XL, Song XB, Hu YL, Feng ZT, i in. Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J Histochem Cytochem* [Internet]. styczeń 2007 [cytowane 8 maj 2021];55(1):1–19. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16899765/>
34. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, i in. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* [Internet]. 24 marzec 2000 [cytowane 8 maj 2021];470(2):113–7. Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2800%2901302-8>
35. Wang H, Ward N, Boswell M, Katz DM. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *Eur J Neurosci* [Internet]. 1 marzec 2006 [cytowane 8 maj 2021];23(6):1665–70. Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2006.04682.x>
36. Pius-Sadowska E, Machaliński B. BDNF – A key player in cardiovascular system [Internet]. T. 110, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press; 2017 [cytowane 8 maj 2021]. s. 54–60. Dostępne na: <http://www.jmcc-online.com/article/S002228281730161X/fulltext>
37. Anders QS, Ferreira LVB, Rodrigues LC de M, Nakamura-Palacios EM. BDNF mRNA Expression in Leukocytes and Frontal Cortex Function in Drug Use Disorder. *Front Psychiatry* [Internet]. 19 maj 2020 [cytowane 8 maj 2021];11:469. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2020.00469/full>
38. Chacón-Fernández P, Säuberli K, Colzani M, Moreau T, Ghevaert C, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor in megakaryocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 6 maj 2016 [cytowane 8 maj 2021];291(19):9872–81. Dostępne na: <http://www.jbc.org/article/S0021925820401292/fulltext>
39. Amadio P, Sandrini L, Ieraci A, Tremoli E, Barbieri S. Effect of Clotting Duration and Temperature on BDNF Measurement in Human Serum. *Int J Mol Sci* [Internet]. 15 wrzesień 2017 [cytowane 8 maj 2021];18(9):1987. Dostępne na: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/9/1987>
40. Yin B, Ma ZY, Zhou ZW, Gao WC, Du ZG, Zhao ZH, i in. The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. *Oncogene* [Internet]. 5 luty 2015 [cytowane 8 maj 2021];34(6):761–70. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24531713/>
41. Zhang S yang, Hui L ping, Li C yan, Gao J, Cui Z shi, Qiu X shan. More expression of BDNF associates with lung squamous cell carcinoma and is critical to the proliferation and invasion of lung cancer cells. *BMC Cancer* [Internet]. 29 luty 2016 [cytowane 8 maj 2021];16(1). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26926340/>

42. Radin DP, Patel P. BDNF: An oncogene or tumor suppressor? [Internet]. T. 37, *Anticancer Research*. International Institute of Anticancer Research; 2017 [cytowane 8 maj 2021]. s. 3983–90. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28739680/>
43. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and ratBDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* [Internet]. 15 luty 2007 [cytowane 9 maj 2021];85(3):525–35. Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.21139>
44. Pruunsild P, Kazantseval A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. 1 wrzesień 2007;90(3):397–406.
45. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* [Internet]. 1 kwiecień 1998 [cytowane 5 sierpień 2021];20(4):709–26. Dostępne na: <http://www.cell.com/article/S0896627300810107/fulltext>
46. Zheng F, Zhou X, Luo Y, Xiao H, Wayman G, Wang H. Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Exon IV Transcription through Calcium Responsive Elements in Cortical Neurons. Amédée T, redaktor. *PLoS One* [Internet]. 9 grudzień 2011 [cytowane 5 sierpień 2021];6(12):e28441. Dostępne na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028441>
47. Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva A, Soderling TR. Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity [Internet]. T. 59, *Neuron*. Cell Press; 2008 [cytowane 16 wrzesień 2021]. s. 914–31. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18817731/>
48. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory [Internet]. T. 14, *Current Opinion in Neurobiology*. *Curr Opin Neurobiol*; 2004 [cytowane 16 wrzesień 2021]. s. 311–7. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15194111/>
49. Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME. A Biological Function for the Neuronal Activity-Dependent Component of Bdnf Transcription in the Development of Cortical Inhibition. *Neuron* [Internet]. 26 listopad 2008 [cytowane 5 sierpień 2021];60(4):610–24. Dostępne na: <http://www.cell.com/article/S0896627308008027/fulltext>
50. Notaras M, van den Buuse M. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation. *Neuroscientist*. 2019;25(5):434–54.
51. An JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, i in. Distinct Role of Long 3' UTR BDNF mRNA in Spine Morphology and Synaptic Plasticity in Hippocampal Neurons. *Cell* [Internet]. 11 lipiec 2008 [cytowane 5 sierpień 2021];134(1):175–87. Dostępne na: <http://www.cell.com/article/S0092867408007083/fulltext>
52. Lau AG, Irier HA, Gu J, Tian D, Ku L, Liu G, i in. Distinct 3'UTRs differentially regulate activity-dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 7 wrzesień 2010 [cytowane 5 sierpień

- 2021];107(36):15945–50. Dostępne na: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002929107
53. Tongiorgi E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: Facts and open questions. T. 61, *Neuroscience Research*. Elsevier; 2008. s. 335–46.
54. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, i in. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol* [Internet]. 19 marzec 2012 [cytowane 9 maj 2021];196(6):775–88. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC3308691/](http://pmc/articles/PMC3308691/)
55. Mellios N, Huang HS, Grigorenko A, Rogaev E, Akbarian S. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1 październik 2008 [cytowane 5 sierpień 2021];17(19):3030–42. Dostępne na: <https://academic.oup.com/hmg/article/17/19/3030/2385846>
56. Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers [Internet]. T. 36, *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group; 2014 [cytowane 5 sierpień 2021]. s. 149–57. Dostępne na: www.chinaphar.com
57. Colucci-D'amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):1–29.
58. Foltran RB, Diaz SL. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J Neurochem* [Internet]. 1 lipiec 2016 [cytowane 9 maj 2021];138(2):204–21. Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13658>
59. Lu J, Wu Y, Sousa N, Almeida OFX. SMAD pathway mediation of BDNF and TGFβ2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons. *Development*. 15 lipiec 2005;132(14):3231–42.
60. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity [Internet]. T. 38, *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer New York LLC; 2018 [cytowane 9 maj 2021]. s. 579–93. Dostępne na: <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
61. Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, Ibi D, Someya E, Koike H, i in. Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *J Neurosci* [Internet]. 7 wrzesień 2011 [cytowane 9 maj 2021];31(36):12963–71. Dostępne na: <https://www.jneurosci.org/content/31/36/12963>
62. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, i in. Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *J Biol Chem* [Internet]. 20 kwiecień 2001 [cytowane 9 maj 2021];276(16):12660–6. Dostępne na: <http://www.jbc.org>

63. Sasi M, Vignoli B, Canossa M, Blum R. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling [Internet]. T. 469, Pflugers Archiv : European journal of physiology. Springer; 2017 [cytowane 9 maj 2021]. s. 593–610. Dostępne na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-017-1964-4>
64. Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, i in. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* [Internet]. luty 2009 [cytowane 9 maj 2021];12(2):113–5. Dostępne na: </pmc/articles/PMC2737352/>
65. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609–42.
66. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways [Internet]. T. 361, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society; 2006 [cytowane 8 maj 2021]. s. 1545–64. Dostępne na: </pmc/articles/PMC1664664/>
67. Anastasia A, Deinhardt K, Chao M V., Will NE, Irmady K, Lee FS, i in. Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nat Commun* [Internet]. 18 wrzesień 2013 [cytowane 6 sierpień 2021];4. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24048383/>
68. Dincheva I, Glatt CE, Lee FS. Impact of the BDNF Val66Met polymorphism on cognition: Implications for behavioral genetics. *Neuroscientist* [Internet]. październik 2012 [cytowane 6 sierpień 2021];18(5):439–51. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22367929/>
69. Montag C, Basten U, Stelzel C, Fiebach CJ, Reuter M. The BDNF Val66Met polymorphism and anxiety: Support for animal knock-in studies from a genetic association study in humans. *Psychiatry Res* [Internet]. sierpień 2010 [cytowane 6 sierpień 2021];179(1):86–90. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20478625/>
70. Gehler S, Gallo G, Veien E, Letourneau PC. p75 Neurotrophin Receptor Signaling Regulates Growth Cone Filopodial Dynamics through Modulating RhoA Activity. *J Neurosci* [Internet]. 5 maj 2004 [cytowane 9 maj 2021];24(18):4363–72. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15128850/>
71. Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* [Internet]. 1999 [cytowane 9 maj 2021];24(3):585–93. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10595511/>
72. Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function [Internet]. T. 14, *Nature Reviews Neuroscience*. *Nat Rev Neurosci*; 2013 [cytowane 9 maj 2021]. s. 7–23. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23254191/>
73. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, i in. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* [Internet]. sierpień 2005 [cytowane 9 maj 2021];8(8):1069–77. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16025106/>

74. Yang J, Harte-Hargrove LC, Siao CJ, Marinic T, Clarke R, Ma Q, i in. ProBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus. *Cell Rep* [Internet]. 2014 [cytowane 9 maj 2021];7(3):796–806. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24746813/>
75. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677–736.
76. Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* [Internet]. 1986 [cytowane 4 maj 2021];319(6056):743–8. Dostępne na: <https://www.nature.com/articles/319743a0>
77. Barbacid M, Lamballe F, Pulido D, Klein R. The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *BBA - Rev Cancer*. 1991;1072(2–3):115–27.
78. Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao M V., Parada LF. The trk proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* (80-). 1991;252(5005):554–8.
79. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(3):381–91.
80. Klein R, Jing S, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* [Internet]. 5 kwiecień 1991 [cytowane 4 maj 2021];65(1):189–97. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1849459/>
81. Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, i in. Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron* [Internet]. 1993 [cytowane 4 maj 2021];10(2):137–49. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7679912/>
82. Miller FD, Kaplan DR. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(8):1045–53.
83. Stoilov P, Stamm S, Castren E. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2002 [cytowane 5 maj 2021];290(3):1054–65. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11798182/>
84. Fenner BM. Truncated TrkB: Beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2012;23(1–2):15–24. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.01.002>
85. McCarty JH, Feinstein SC. Activation loop tyrosines contribute varying roles to TrkB autophosphorylation and signal transduction. *Oncogene* [Internet]. 2 kwiecień 1998 [cytowane 28 wrzesień 2021];16(13):1691–700. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9582017/>

86. Haniu M, Talvenheimo J, Le J, Katta V, Welcher A, Rohde A MF. Extracellular domain of neurotrophin receptor *trkB*: Disulfide structure, N-glycosylation sites, and ligand binding. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1995 [cytowane 6 maj 2021];322(1):256–64. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7574684/>
87. Luberg K, Wong J, Weickert CS, Timmusk T. Human *TrkB* gene: Novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem*. 2010;113(4):952–64.
88. Luikart BW, Nef S, Virmani T, Lush ME, Liu Y, Kavalali ET, i in. *TrkB* has a cell-autonomous role in the establishment of hippocampal schaffer collateral synapses. *J Neurosci* [Internet]. 13 kwiecień 2005 [cytowane 7 maj 2021];25(15):3774–86. Dostępne na: <https://europepmc.org/articles/PMC6724922>
89. Haniu M, Montestrucque S, Bures EJ, Talvenheimo J, Toso R, Lewis-Sandy S, i in. Interactions between brain-derived neurotrophic factor and the *TRKB* receptor. Identification of two ligand binding domains in soluble *TRKB* by affinity separation and chemical cross-linking. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25296–303.
90. Ninkina N, Grashchuck M, Buchman VL, Davies AM. *TrkB* variants with deletions in the leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J Biol Chem* [Internet]. 16 maj 1997 [cytowane 6 maj 2021];272(20):13019–25. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9148911/>
91. Strohmaier C, Carter BD, Urfer R, Barde YA, Dechant G. A splice variant of the neurotrophin receptor *trkB* with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* [Internet]. 1 lipiec 1996 [cytowane 7 maj 2021];15(13):3332–7. Dostępne na: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14481896/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14481896/)
92. Naylor RL, Robertson AGS, Allen SJ, Mason GGF, Burston JJ, Tyler SJ, i in. A discrete domain of the human *TrkB* receptor defines the binding sites for BDNF and NT-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291(3):501–7.
93. Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, i in. Anterograde Transport of *TrkB* in Axons Is Mediated by Direct Interaction with *Slp1* and *Rab27*. *Dev Cell* [Internet]. 19 maj 2009 [cytowane 8 maj 2021];16(5):675–86. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19460344/>
94. Huang SH, Duan S, Sun T, Wang J, Zhao L, Geng Z, i in. *JIP3* mediates *TrkB* axonal anterograde transport and enhances BDNF signaling by directly bridging *TrkB* with kinesin-1. *J Neurosci* [Internet]. 20 lipiec 2011 [cytowane 8 maj 2021];31(29):10602–14. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21775604/>
95. Meldolesi J. Neurotrophin receptors in the pathogenesis, diagnosis and therapy of neurodegenerative diseases [Internet]. T. 121, Pharmacological Research. Academic Press; 2017 [cytowane 8 maj 2021]. s. 129–37. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28438600/>

96. Meldolesi J. Neurotrophin trk receptors: New targets for cancer therapy. W: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* [Internet]. Springer Verlag; 2018 [cytowane 8 maj 2021]. s. 67–79. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28884193/>
97. Ohira K, Hayashi M. Expression of TrkB subtypes in the adult monkey cerebellar cortex. *J Chem Neuroanat.* 1 marzec 2003;25(3):175–83.
98. Tang S, MacHaalani R, Waters KA. Immunolocalization of pro- and mature-brain derived neurotrophic factor (BDNF) and receptor TrkB in the human brainstem and hippocampus. *Brain Res.* 1 październik 2010;1354:1–14.
99. Li E, Hristova K. Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies [Internet]. T. 45, *Biochemistry*. NIH Public Access; 2006 [cytowane 6 sierpień 2021]. s. 6241–51. Dostępne na: </pmc/articles/PMC4301406/>
100. Valley CC, Lewis AK, Sachs JN. Piecing it together: Unraveling the elusive structure-function relationship in single-pass membrane receptors. T. 1859, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V.; 2017. s. 1398–416.
101. Bocharov E V., Mayzel ML, Volynsky PE, Mineev KS, Tkach EN, Ermolyuk YS, i in. Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: Helix packing diversity among receptor tyrosine kinases. *Biophys J* [Internet]. 3 marzec 2010 [cytowane 6 sierpień 2021];98(5):881–9. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20197042/>
102. Bocharov E V., Lesovoy DM, Goncharuk SA, Goncharuk M V., Hristova K, Arseniev AS. Structure of FGFR3 transmembrane domain dimer: Implications for signaling and human pathologies. *Structure.* 5 listopad 2013;21(11):2087–93.
103. Ahmed F, Hristova K. Dimerization of the Trk receptors in the plasma membrane: Effects of their cognate ligands. *Biochem J.* 2018;475(22):3669–85.
104. Sarabipour S, Ballmer-Hofer K, Hristova K. VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *Elife.* 7 kwiecień 2016;5(APRIL2016).
105. Bell CA, Tynan JA, Hart KC, Meyer AN, Robertson SC, Donoghue DJ. Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2000 [cytowane 6 sierpień 2021];11(10):3589–99. Dostępne na: </pmc/articles/PMC15017/>
106. Bocharov E V., Sharonov G V., Bocharova O V., Pavlov K V. Conformational transitions and interactions underlying the function of membrane embedded receptor protein kinases. T. 1859, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V.; 2017. s. 1417–29.
107. Lu C, Mi LZ, Schürpf T, Walz T, Springer TA. Mechanisms for kinase-mediated dimerization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 2 listopad 2012 [cytowane 6 sierpień 2021];287(45):38244–53. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22988250/>

108. Lu C, Mi L-Z, Grey MJ, Zhu J, Graef E, Yokoyama S, i in. Structural Evidence for Loose Linkage between Ligand Binding and Kinase Activation in the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol Cell Biol* [Internet]. 15 listopad 2010 [cytowane 6 sierpień 2021];30(22):5432–43. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20837704/>
109. Lemmon MA, Schlessinger J. Review Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. 2010;1117–34.
110. Maruyama I. Mechanisms of Activation of Receptor Tyrosine Kinases: Monomers or Dimers. *Cells*. 2014;3(2):304–30.
111. Zahavi EE, Steinberg N, Altman T, Chein M, Joshi Y, Gradus-Pery T, i in. The receptor tyrosine kinase TrkB signals without dimerization at the plasma membrane. *Sci Signal*. 2018;11(529).
112. Duman RS, Voleti B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: Novel mechanisms for rapid-acting agents [Internet]. T. 35, *Trends in Neurosciences*. Elsevier; 2012 [cytowane 6 sierpień 2021]. s. 47–56. Dostępne na: <http://www.cell.com/article/S0166223611001913/fulltext>
113. Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* [Internet]. 26 wrzesień 2002 [cytowane 15 maj 2021];36(1):121–37. Dostępne na: <http://www.neuron>.
114. Platholi J, Lee FS. Neurotrophic factors. *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. 2018. 55–64 s.
115. Zhang SQ, Tsiaras WG, Araki T, Wen G, Minichiello L, Klein R, i in. Receptor-Specific Regulation of Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation by the Protein Tyrosine Phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol* [Internet]. 15 czerwiec 2002 [cytowane 15 maj 2021];22(12):4062–72. Dostępne na: </pmc/articles/PMC133866/>
116. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase- Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* [Internet]. 7 grudzień 2005 [cytowane 15 maj 2021];25(49):11300–12. Dostępne na: <https://www.jneurosci.org/content/25/49/11300>
117. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* [Internet]. 7 grudzień 2005 [cytowane 15 maj 2021];25(49):11288–99. Dostępne na: <https://www.jneurosci.org/content/25/49/11288>
118. Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein Kinase SGK Mediates Survival Signals by Phosphorylating the Forkhead Transcription Factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* [Internet]. luty 2001 [cytowane 8 maj 2022];21(3):952–65. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11154281/>
119. Caviades A, Lafourcade C, Soto C, Wyneken U. BDNF/NF- κ B Signaling in the Neurobiology of Depression. *Curr Pharm Des* [Internet]. 6 wrzesień 2017 [cytowane 15 maj 2021];23(21). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28078988/>

120. Voss P, Thomas ME, Cisneros-Franco JM, de Villers-Sidani É. Dynamic brains and the changing rules of neuroplasticity: Implications for learning and recovery. *Front Psychol.* 4 październik 2017;8(OCT):1657.
121. Nahum M, Lee H, Merzenich MM. Principles of neuroplasticity-based rehabilitation. W: *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V.; 2013. s. 141–71.
122. Jin J, Maren S. Prefrontal-hippocampal interactions in memory and emotion [Internet]. T. 9, *Frontiers in Systems Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2015 [cytowane 24 maj 2021]. s. 170. Dostępne na: </pmc/articles/PMC4678200/>
123. Kumar A, Pareek V, Faiq MA, Ghosh SK, Kumari C. Adult neurogenesis in humans: A review of basic concepts, history, current research, and clinical implications [Internet]. T. 16, *Innovations in Clinical Neuroscience*. Matrix Medical Communications; 2019 [cytowane 24 maj 2021]. s. 30–7. Dostępne na: </pmc/articles/PMC6659986/>
124. Ruiz S, Buyukturkoglu K, Rana M, Birbaumer N, Sitaram R. Real-time fMRI brain computer interfaces: Self-regulation of single brain regions to networks [Internet]. T. 95, *Biological Psychology*. *Biol Psychol*; 2014 [cytowane 24 maj 2021]. s. 4–20. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23643926/>
125. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo J. Gliogenesis and Glial Pathology in Depression. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* [Internet]. 18 kwiecień 2008 [cytowane 24 maj 2021];6(3):219–33. Dostępne na: </pmc/articles/PMC2918806/>
126. Dwivedi Y. The Neurobiological Basis of Suicide [Internet]. *The Neurobiological Basis of Suicide*. CRC Press/Taylor & Francis; 2012 [cytowane 24 maj 2021]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23035294>
127. Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Dwivedi Y. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 9 grudzień 2008 [cytowane 24 maj 2021];11(08):1047. Dostępne na: <https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1017/S1461145708009000>
128. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BAA, Penninx BWJH, Elzinga BM. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: Evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol Psychiatry* [Internet]. 20 sierpień 2014 [cytowane 26 maj 2021];19(7):791–800. Dostępne na: www.nature.com/mp
129. Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 1 grudzień 2008 [cytowane 26 maj 2021];11(8):1169–80. Dostępne na: <https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1017/S1461145708009309>

130. Odaka H, Adachi N, Numakawa T. Impact of glucocorticoid on neurogenesis [Internet]. T. 12, *Neural Regeneration Research*. Medknow Publications; 2017 [cytowane 26 maj 2021]. s. 1028–35. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC5558474/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23842648/)
131. Castreñ E. Neuronal network plasticity and recovery from depression [Internet]. T. 70, *JAMA Psychiatry*. American Medical Association; 2013 [cytowane 26 maj 2021]. s. 983–9. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23842648/>
132. Castrén E, Kojima M. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2017;97:119–26. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.010>
133. Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* [Internet]. kwiecień 2006 [cytowane 26 maj 2021];9(4):519–25. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16501568/>
134. Rantamäki T, Hendolin P, Kankaanpää A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, i in. Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-C γ signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(10):2152–62.
135. Castrén E, Rantamäki T. Role of brain-derived neurotrophic factor in the aetiology of depression: Implications for pharmacological treatment [Internet]. T. 24, *CNS Drugs*. Springer; 2010 [cytowane 26 maj 2021]. s. 1–7. Dostępne na: <https://link.springer.com/article/10.2165/11530010-000000000-00000>
136. Lepack AE, Fuchikami M, Dwyer JM, Banasr M, Duman RS. BDNF Release Is Required for the Behavioral Actions of Ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 14 styczeń 2015 [cytowane 26 maj 2021];18(1):pyu033–pyu033. Dostępne na: <https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1093/ijnp/pyu033>
137. Monteggia LM, Zarate C. Antidepressant actions of ketamine: From molecular mechanisms to clinical practice. T. 30, *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd; 2015. s. 139–43.
138. Peyrovian B, McIntyre RS, Phan L, Lui LMW, Gill H, Majeed A, i in. Registered clinical trials investigating ketamine for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res*. 1 lipiec 2020;127:1–12.
139. Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. styczeń 1996 [cytowane 26 maj 2021];56(1):131–7. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8981620/>
140. Shirayama Y, Chen ACH, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* [Internet]. 15 kwiecień 2002 [cytowane 26 maj 2021];22(8):3251–61. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11943826/>

141. Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res.* 10 marzec 2005;1037(1–2):204–8.
142. Eisch AJ, Bolaños CA, De Wit J, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, i in. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: A role in depression. *Biol Psychiatry* [Internet]. 15 listopad 2003 [cytowane 26 maj 2021];54(10):994–1005. Dostępne na: <http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006322303008692/fulltext>
143. Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobald D, Malkovska I, Nef S, i in. Brain-Derived Neurotrophic Factor Conditional Knockouts Show Gender Differences in Depression-Related Behaviors. *Biol Psychiatry* [Internet]. 15 styczeń 2007 [cytowane 26 maj 2021];61(2):187–97. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16697351/>
144. Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, i in. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 20 lipiec 2004 [cytowane 26 maj 2021];101(29):10827–32. Dostępne na: www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0402141101
145. Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, i in. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci.* 2003;23(1):349–57.
146. Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon CH, Kernie SG, i in. TrkB Regulates Hippocampal Neurogenesis and Governs Sensitivity to Antidepressive Treatment. *Neuron* [Internet]. 14 sierpień 2008 [cytowane 26 maj 2021];59(3):399–412. Dostępne na: <http://www.cell.com/article/S0896627308005412/fulltext>
147. Laje G, Lally N, Mathews D, Brutsche N, Chemerinski A, Akula N, i in. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and antidepressant efficacy of ketamine in depressed patients [Internet]. T. 72, *Biological Psychiatry*. NIH Public Access; 2012 [cytowane 26 maj 2021]. s. e27. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC3786174/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22311744/)
148. Colle R, Gressier F, Verstuyft C, Deflesselle E, Lépine JP, Ferreri F, i in. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and 6-month antidepressant remission in depressed Caucasian patients. *J Affect Disord* [Internet]. 1 kwiecień 2015 [cytowane 26 maj 2021];175:233–40. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25658497/>
149. Pardridge WM. Brain drug development and brain drug targeting [Internet]. T. 24, *Pharmaceutical Research*. Pharm Res; 2007 [cytowane 9 lipiec 2021]. s. 1729–32. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17629776/>
150. Fukuchi M, Okuno Y, Nakayama H, Nakano A, Mori H, Mitazaki S, i in. Screening inducers of neuronal BDNF gene transcription using primary cortical cell cultures from BDNF-luciferase transgenic mice. *Sci Rep* [Internet]. 1 grudzień 2019 [cytowane 9 lipiec 2021];9(1):1–14. Dostępne na: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48361-4>

151. Kells AP, Fong DM, Dragunow M, During MJ, Young D, Connor B. AAV-mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of Huntington disease. *Mol Ther* [Internet]. 2004 [cytowane 9 lipiec 2021];9(5):682–8. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15120329/>
152. Zhang HS, Kim E, Lee S, Ahn IS, Jang JH. Transduction of striatum and cortex tissues by adeno-associated viral vectors produced by herpes simplex virus- and baculovirus-based methods. *J Virol Methods* [Internet]. styczeń 2012 [cytowane 9 lipiec 2021];179(1):276–80. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22015677/>
153. Katsu-Jiménez Y, Loría F, Corona JC, Díaz-Nido J. Gene transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) prevents neurodegeneration triggered by FXN deficiency. *Mol Ther* [Internet]. 1 maj 2016 [cytowane 9 lipiec 2021];24(5):877–89. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26849417/>
154. Tuinstra HM, Aviles MO, Shin S, Holland SJ, Zelivyanskaya ML, Fast AG, i in. Multifunctional, multichannel bridges that deliver neurotrophin encoding lentivirus for regeneration following spinal cord injury. *Biomaterials* [Internet]. luty 2012 [cytowane 9 lipiec 2021];33(5):1618–26. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22130565/>
155. Lopes CDF, Gonçalves NP, Gomes CP, Saraiva MJ, Pêgo AP. BDNF gene delivery mediated by neuron-targeted nanoparticles is neuroprotective in peripheral nerve injury. *Biomaterials* [Internet]. 1 marzec 2017 [cytowane 9 lipiec 2021];121:83–96. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28081461/>
156. Schmidt N, Schulze J, Warwas DP, Ehlert N, Lenarz T, Warnecke A, i in. Long-term delivery of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) from nanoporous silica nanoparticles improves the survival of spiral ganglion neurons in vitro. Santos HA, redaktor. *PLoS One* [Internet]. 27 marzec 2018 [cytowane 9 lipiec 2021];13(3):e0194778. Dostępne na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0194778>
157. Rodrigues Hell RC, Silva Costa MM, Goes AM, Oliveira ALR. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis*. 1 luty 2009;33(2):290–300.
158. Alcalá-Barraza SR, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH, McLoon LK. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. *J Drug Target* [Internet]. kwiecień 2010 [cytowane 9 lipiec 2021];18(3):179–90. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC3732751/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/200000000/)
159. Zhu J, Jiang Y, Xu G, Liu X. Intranasal administration: A potential solution for cross-BBB delivering neurotrophic factors [Internet]. T. 27, Histology and Histopathology. *Histol Histopathol*; 2012 [cytowane 9 lipiec 2021]. s. 537–48. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22419018/>
160. Sansevero G, Baroncelli L, Scali M, Sale A. Intranasal BDNF administration promotes visual function recovery in adult amblyopic rats. *Neuropharmacology* [Internet]. 1 luty 2019 [cytowane 9 lipiec 2021];145(Pt A):114–22. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29428822/>

161. Thorne RG, Frey WH. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: Pharmacokinetic considerations [Internet]. T. 40, *Clinical Pharmacokinetics*. Adis International Ltd; 2001 [cytowane 9 lipiec 2021]. s. 907–46. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11735609/>
162. Pires A, Fortuna A, Alves G, Falcão A. Intranasal drug delivery: How, why and what for? [Internet]. T. 12, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Canadian Society for Pharmaceutical Sciences; 2009 [cytowane 9 lipiec 2021]. s. 288–311. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20067706/>
163. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 1 marzec 2001 [cytowane 26 kwiecień 2022];46(1–3):3–26. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11259830/>
164. Boado RJ. A new generation of neurobiological drugs engineered to overcome the challenges of brain drug delivery [Internet]. T. 21, *Drug News and Perspectives*. Drug News Perspect; 2008 [cytowane 9 lipiec 2021]. s. 489–503. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19180267/>
165. Sakane T, Pardridge WM. Carboxyl-directed pegylation of brain-derived neurotrophic factor markedly reduces systemic clearance with minimal loss of biologic activity. *Pharm Res* [Internet]. 1997 [cytowane 9 lipiec 2021];14(8):1085–91. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9279893/>
166. Hoshino K, Eda A, Kurokawa Y, Shimizu N. Production of brain-derived neurotrophic factor in *Escherichia coli* by coexpression of dsb proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2002 [cytowane 21 kwiecień 2022];66(2):344–50. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11999407/>
167. Bartus RT, Johnson EM. Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 1: Where have we been and what have we learned? [Internet]. T. 97, *Neurobiology of Disease*. Academic Press Inc.; 2017 [cytowane 9 lipiec 2021]. s. 156–68. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27063798/>
168. Bartus RT, Johnson EM. Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 2: Where do we stand and where must we go next? *Neurobiol Dis* [Internet]. 1 styczeń 2017 [cytowane 28 wrzesień 2021];97(Pt B):169–78. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996116300729>
169. Sertkaya A, Wong HH, Jessup A, Beleche T. Key cost drivers of pharmaceutical clinical trials in the United States. *Clin Trials* [Internet]. 1 kwiecień 2016 [cytowane 20 maj 2021];13(2):117–26. Dostępne na: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1740774515625964>
170. Lee JA, Uhlik MT, Moxham CM, Tomandl D, Sall DJ. Modern phenotypic drug discovery is a viable, neoclassic pharma strategy [Internet]. T. 55, *Journal of Medicinal Chemistry*. *J Med Chem*; 2012 [cytowane 7 sierpień 2021]. s. 4527–38. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22409666/>

171. Lage OM, Ramos MC, Calisto R, Almeida E, Vasconcelos V, Vicente F. Current screening methodologies in drug discovery for selected human diseases [Internet]. T. 16, *Marine Drugs*. MDPI AG; 2018 [cytowane 7 sierpień 2021]. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC6117650/](#)
172. Bacilieri M, Moro S. Ligand-Based Drug Design Methodologies in Drug Discovery Process: An Overview. *Curr Drug Discov Technol*. 8 marzec 2007;3(3):155–65.
173. Abbott A. Novartis to shut brain research facility [Internet]. T. 480, *Nature*. Nature; 2011 [cytowane 24 maj 2021]. s. 161–2. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22158218/>
174. Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research [Internet]. T. 3, *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*. Elsevier Inc; 2017 [cytowane 7 sierpień 2021]. s. 651–7. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC5725284/](#)
175. Gribkoff VK, Kaczmarek LK. The need for new approaches in CNS drug discovery: Why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes [Internet]. T. 120, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2017 [cytowane 24 maj 2021]. s. 11–9. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC5820030/](#)
176. Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, i in. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(6):2687–92.
177. Spencer JPE. Flavonoids: Modulators of brain function? [Internet]. T. 99, *British Journal of Nutrition*. Cambridge University Press; 2008 [cytowane 23 maj 2021]. s. ES60–77. Dostępne na: <https://doi.org/10.1017/S0007114508965776>
178. Solanki I, Parihar P, Mansuri ML, Parihar MS. Flavonoid-Based Therapies in the Early Management of Neurodegenerative Diseases. *Adv Nutr* [Internet]. 1 styczeń 2015 [cytowane 23 maj 2021];6(1):64–72. Dostępne na: <https://academic.oup.com/advances/article/6/1/64/4558042>
179. Jang SW, Liu X, Chan CB, France SA, Sayeed I, Tang W, i in. Deoxygedunin, a natural product with potent neurotrophic activity in mice. *PLoS One*. 2010;5(7).
180. Hanson ND, Owens MJ, Nemeroff CB. Depression, antidepressants, and neurogenesis: A critical reappraisal [Internet]. T. 36, *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group; 2011 [cytowane 23 maj 2021]. s. 2589–602. Dostępne na: [/pmc/articles/PMC3230505/](#)
181. Park SC. Neurogenesis and antidepressant action [Internet]. T. 377, *Cell and Tissue Research*. Springer Verlag; 2019 [cytowane 23 maj 2021]. s. 95–106. Dostępne na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-019-03043-5>
182. Liu X, Chan CB, Jang SW, Pradoldej S, Huang J, He K, i in. A synthetic 7,8-dihydroxyflavone derivative promotes neurogenesis and exhibits potent antidepressant effect. *J Med Chem*. 2010;53(23):8274–86.

183. Liu X, Qi Q, Xiao G, Li J, Luo HR, Ye K. O-methylated metabolite of 7,8-dihydroxyflavone activates TrkB receptor and displays antidepressant activity. *Pharmacology*. 2013;91(3–4):185–200.
184. Zhang MW, Zhang S feng, Li ZH, Han F. 7,8-Dihydroxyflavone reverses the depressive symptoms in mouse chronic mild stress. *Neurosci Lett* [Internet]. 2016;635:33–8. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.035>
185. Zhang JC, Wu J, Fujita Y, Yao W, Ren Q, Yang C, i in. Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 1 styczeń 2014 [cytowane 23 maj 2021];18(4):1–12. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25628381/>
186. Zhang JC, Yao W, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, i in. Comparison of ketamine, 7,8-dihydroxyflavone, and ANA-12 antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 1 grudzień 2015 [cytowane 23 maj 2021];232(23):4325–35. Dostępne na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-015-4062-3>
187. Shirayama Y, Yang C, Zhang J chun, Ren Q, Yao W, Hashimoto K. Alterations in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain regions of a learned helplessness rat model and the antidepressant effects of a TrkB agonist and antagonist. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2015;25(12):2449–58. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.09.002>
188. Bollen E, Vanmierlo T, Akkerman S, Wouters C, Steinbusch HMW, Prickaerts J. 7,8-Dihydroxyflavone improves memory consolidation processes in rats and mice. *Behav Brain Res*. 15 listopad 2013;257:8–12.
189. Aytan N, Choi JK, Carreras I, Crabtree L, Nguyen B, Lehar M, i in. Protective effects of 7,8-dihydroxyflavone on neuropathological and neurochemical changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*. 5 czerwiec 2018;828:9–17.
190. Devi L, Ohno M. 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 7 styczeń 2012 [cytowane 23 maj 2021];37(2):434–44. Dostępne na: www.neuropsychopharmacology.org
191. Li X-H, Dai C-F, Chen L, Zhou W-T, Han H-L, Dong Z-F. 7,8-dihydroxyflavone Ameliorates Motor Deficits Via Suppressing α -synuclein Expression and Oxidative Stress in the MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 1 lipiec 2016 [cytowane 23 maj 2021];22(7):617–24. Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1111/cns.12555>
192. Sconce MD, Churchill MJ, Moore C, Meshul CK. Intervention with 7,8-dihydroxyflavone blocks further striatal terminal loss and restores motor deficits in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2 kwiecień 2015;290:454–71.

193. Barriga GGD, Giralt A, Anglada-Huguet M, Gaja-Capdevila N, Orlandi JG, Soriano J, i in. 7,8-dihydroxyflavone ameliorates cognitive and motor deficits in a Huntington's disease mouse model through specific activation of the PLC γ 1 pathway. *Hum Mol Genet* [Internet]. 15 sierpień 2017 [cytowane 23 maj 2021];26(16):3144–60. Dostępne na: <https://academic.oup.com/hmg/article/26/16/3144/3852118>
194. Massa SM, Yang T, Xie Y, Shi J, Bilgen M, Joyce JN, i in. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1774–85.
195. Shen J, Ghai K, Sompol P, Liu X, Cao X, Iuvone PM, i in. N-acetyl serotonin derivatives as potent neuroprotectants for retinas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(9):3540–5.
196. Jang SW, Liu X, Pradoldej S, Tosini G, Chang Q, Iuvone PM, i in. N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3876–81.
197. Wilkie N, Wingrove PB, Bilslund JG, Young L, Harper SJ, Hefti F, i in. The non-peptidyl fungal metabolite L-783,281 activates Trk neurotrophin receptors. *J Neurochem*. 2001;78(5):1135–45.
198. Fukuda M, Takatori A, Nakamura Y, Suganami A, Hoshino T, Tamura Y, i in. Effects of novel small compounds targeting TrkB on neuronal cell survival and depression-like behavior. *Neurochem Int* [Internet]. 2016;97:42–8. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.04.017>
199. Todd D, Gowers I, Dowler SJ, Wall MD, McAllister G, Fischer DF, i in. A monoclonal antibody TrkB receptor agonist as a potential therapeutic for huntington's disease. *PLoS One*. 2014;9(2).
200. Boltaev U, Meyer Y, Tolibzoda F, Jacques T, Gassaway M, Xu Q, i in. Multiplex quantitative assays indicate a need for re-evaluating reported small-molecule TrkB agonists. *Sci Signal*. 2017;10(493).
201. Presgraves SP, Borwege S, Millan MJ, Joyce JN. Involvement of dopamine D $2/D3$ receptors and BDNF in the neuroprotective effects of S32504 and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium in terminally differentiated SH-SY5Y cells. *Exp Neurol*. 2004;190(1):157–70.
202. Bowes J, Brown AJ, Hamon J, Jarolimek W, Sridhar A, Waldron G, i in. Reducing safety-related drug attrition: The use of in vitro pharmacological profiling [Internet]. T. 11, *Nature Reviews Drug Discovery*. *Nat Rev Drug Discov*; 2012 [cytowane 17 maj 2021]. s. 909–22. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23197038/>
203. Gudasheva TA, Logvinov IO, Antipova TA, Seredenin SB. Brain-derived neurotrophic factor loop 4 dipeptide mimetic GSB-106 activates TrkB, Erk, and Akt and promotes neuronal survival in vitro. *Dokl Biochem Biophys*. 2013;451(1):212–4.

204. Sudarshan K, Boda A kumar, Dogra S, Bose I, Yadav PN, Aidhen IS. Discovery of an isocoumarin analogue that modulates neuronal functions via neurotrophin receptor TrkB. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2019;29(4):585–90. Dostępne na: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.12.057>
205. Liu Y, Johe K, Sun J, Hao X, Wang Y, Bi X, i in. Enhancement of synaptic plasticity and reversal of impairments in motor and cognitive functions in a mouse model of Angelman Syndrome by a small neurogenic molecule, NSI-189. *Neuropharmacology* [Internet]. 2019;144(August 2018):337–44. Dostępne na: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.10.038>
206. ARAI K, SHIMIZU S, TAGUCHI Y, YAMAMOTO Y. Metabolic products of *Aspergillus terreus*. V. Demethylation of asterol quinones. *Chem Pharm Bull* [Internet]. 25 kwiecień 1981 [cytowane 7 kwiecień 2021];29(4):991–9. Dostępne na: http://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/29/4/29_4_991/_article
207. Pirrung MC, Park K, Li Z. Synthesis of 3-Indolyl-2,5-dihydroxybenzoquinones. *Org Lett* [Internet]. 8 luty 2001 [cytowane 7 kwiecień 2021];3(3):365–7. Dostępne na: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ol006852l>
208. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2013 [cytowane 11 luty 2021];1078:9–21. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23975817/>
209. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, i in. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *J Neurochem* [Internet]. 4 styczeń 2002 [cytowane 18 sierpień 2021];75(3):991–1003. Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x>
210. Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2009;10(12):850–60. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2738>
211. Emili M, Guidi S, Uguagliati B, Giacomini A, Bartesaghi R, Stagni F. Treatment with the flavonoid 7,8-Dihydroxyflavone: a promising strategy for a constellation of body and brain disorders. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2020;0(0):1–38. Dostępne na: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1810625>
212. Fumagalli F, Racagni G, Riva MA. The expanding role of BDNF: A therapeutic target for Alzheimer's disease? [Internet]. T. 6, *Pharmacogenomics Journal*. *Pharmacogenomics J*; 2006 [cytowane 17 maj 2021]. s. 8–15. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16314887/>
213. John Harris C, D. Hill R, W. Sheppard D, J. Slater M, F.W. Stouten P. The Design and Application of Target-Focused Compound Libraries. *Comb Chem High Throughput Screen* [Internet]. 23 maj 2011 [cytowane 3 sierpień 2021];14(6):521–31. Dostępne na: </pmc/articles/PMC3182092/>

214. Rainard JM, Pandarakalam GC, McElroy SP. Using Microscale Thermophoresis to Characterize Hits from High-Throughput Screening: A European Lead Factory Perspective [Internet]. T. 23, SLAS Discovery. SAGE Publications Inc.; 2018 [cytowane 11 lipiec 2021]. s. 225–41. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29460707/>
215. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis [Internet]. T. 9, Assay and Drug Development Technologies. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA ; 2011 [cytowane 28 wrzesień 2021]. s. 342–53. Dostępne na: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/adt.2011.0380>
216. Renaud JP, Chung CW, Danielson UH, Egner U, Hennig M, Hubbard RE, i in. Biophysics in drug discovery: Impact, challenges and opportunities [Internet]. T. 15, Nature Reviews Drug Discovery. Nature Publishing Group; 2016 [cytowane 12 lipiec 2021]. s. 679–98. Dostępne na: <https://www.nature.com/articles/nrd.2016.123>
217. Ciulli A. Biophysical screening for the discovery of small-molecule ligands. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2013 [cytowane 12 lipiec 2021];1008:357–88. Dostępne na: </pmc/articles/PMC4441727/>
218. Banfield MJ, Naylor RL, Robertson AGS, Allen SJ, Dawbarn D, Brady RL. Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: The crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure*. 2001;9(12):1191–9.
219. Abdel-Magid AF. Allosteric Modulators: An Emerging Concept in Drug Discovery. *ACS Med Chem Lett* [Internet]. 12 luty 2015 [cytowane 13 lipiec 2021];6(2):104–7. Dostępne na: </pmc/articles/PMC4329591/>
220. Rocheville M, Garland SL. An industrial perspective on positive allosteric modulation as a means to discover safe and selective drugs. T. 7, *Drug Discovery Today: Technologies*. Elsevier Ltd; 2010. s. e87–94.
221. Nemeth EF, Heaton WH, Miller M, Fox J, Balandrin MF, Van Wagenen BC, i in. Pharmacodynamics of the Type II Calcimimetic Compound Cinacalcet HCl. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. luty 2004 [cytowane 13 lipiec 2021];308(2):627–35. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14593085/>
222. Edwards Z, Preuss C V. GABA Receptor Positive Allosteric Modulators [Internet]. *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2020 [cytowane 13 lipiec 2021]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32119330>
223. Vavers E, Zvejniece L, Maurice T, Dambrova M. Allosteric modulators of sigma-1 receptor: A review [Internet]. T. 10, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2019 [cytowane 13 lipiec 2021]. s. 223. Dostępne na: www.frontiersin.org
224. Casarotto P, Giryach M, Fred S, Kovaleva V, Moliner R, Enkavi G, i in. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. 2019;1–15.
225. Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Bradshaw RA. Receptor tyrosine kinase signaling - a proteomic perspective [Internet]. T. 51, *Advances in Enzyme Regulation*.

Adv Enzyme Regul; 2011 [cytowane 21 lipiec 2021]. s. 293–305. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21056590/>

226. Shen J, Sun D, Shao J, Chen Y, Pang K, Guo W, i in. Extracellular Juxtamembrane Motif Critical for TrkB Preformed Dimer and Activation. *Cells*. 2019;8(8):932.

227. Klein R, Conway D, Parada LF, Barbacid M. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* [Internet]. 18 maj 1990 [cytowane 28 wrzesień 2021];61(4):647–56. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2160854/>

228. Zhang B, Salituro G, Szalkowski D, Li Z, Zhang Y, Royo I, i in. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* (80-) [Internet]. 7 maj 1999 [cytowane 30 lipiec 2021];284(5416):974–7. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10320380/>

229. Hubbard SR. The insulin receptor: Both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 1 marzec 2013 [cytowane 1 sierpień 2021];5(3):a008946. Dostępne na: <http://cshperspectives.cshlp.org/>

230. Zhao H, Alam A, San CY, Eguchi S, Chen Q, Lian Q, i in. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: Recent developments [Internet]. T. 1665, *Brain Research*. Elsevier B.V.; 2017 [cytowane 1 sierpień 2021]. s. 1–21. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28396009/>

231. Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. T. 13, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2019. s. 363.

232. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: Mechanisms and models [Internet]. T. 39, *Neuron*. Cell Press; 2003 [cytowane 1 sierpień 2021]. s. 889–909. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12971891/>

233. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2003 [cytowane 1 sierpień 2021];4(5):1–11. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12728264/>

234. Pettifer KM, Jiang S, Bau C, Ballerini P, D'Alimonte I, Werstkiuk ES, i in. MPP⁺-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. *Purinergic Signal* [Internet]. wrzesień 2007 [cytowane 1 sierpień 2021];3(4):399–409. Dostępne na: </pmc/articles/PMC2072917/>

235. Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival [Internet]. T. 15, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2004 [cytowane 1 sierpień 2021]. s. 177–82. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15209377/>

236. Liu X, Obiany O, Chan CB, Huang J, Xue S, Yang JJ, i in. Biochemical and biophysical investigation of the brain-derived neurotrophic factor mimetic 7,8-dihydroxyflavone in the binding and activation of the trkb receptor. *J Biol Chem*. 2014;289(40):27571–84.

237. Chen J, Chua KW, Chua CC, Yu H, Pei A, Chua BHL, i in. Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neurosci Lett* [Internet]. 2011;499(3):181–5. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2011.05.054>
238. Han X, Zhu S, Wang B, Chen L, Li R, Yao W, i in. Antioxidant action of 7,8-dihydroxyflavone protects PC12 cells against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity. *Neurochem Int* [Internet]. 2014;64(1):18–23. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.018>
239. Song Y, Han X. 7,8-Dihydroxyflavone Protects PC12 Cells against MPP+-Induced Cytotoxicity by Heme Oxygenase-1. *Int J Sci*. 2019;8(03):55–9.
240. Chen C, Wang Z, Zhang Z, Liu X, Kang SS, Zhang Y, i in. The prodrug of 7,8-dihydroxyflavone development and therapeutic efficacy for treating Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(3):578–83.
241. Pankiewicz P, Szybiński M, Kisielewska K, Gołębiowski F, Krzemiński P, Rutkowska-Włodarczyk I, i in. Do Small Molecules Activate the TrkB Receptor in the Same Manner as BDNF? Limitations of Published TrkB Low Molecular Agonists and Screening for Novel TrkB Orthosteric Agonists. *Pharmaceuticals* [Internet]. 21 lipiec 2021 [cytowane 16 sierpień 2021];14(8):704. Dostępne na: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/8/704>
242. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art [Internet]. T. 98, *Physiological Reviews*. American Physiological Society; 2018 [cytowane 17 maj 2021]. s. 1591–625. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29848236/>
243. Luscher B, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder [Internet]. T. 16, *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2011 [cytowane 17 maj 2021]. s. 383–406. Dostępne na: www.nature.com/mp
244. Santiago RM, Barbiero J, Martynhak BJ, Boschen SL, Da Silva LM, Werner MFP, i in. Antidepressant-like effect of celecoxib piroxicam in rat models of depression. *J Neural Transm* [Internet]. 24 styczeń 2014 [cytowane 17 maj 2021];121(6):671–82. Dostępne na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-014-1159-5>
245. Atifi-Borel M El, Buggia-Prevot V, Platet N, Benabid AL, Berger F, Sgambato-Faure V. De novo and long-term l-Dopa induce both common and distinct striatal gene profiles in the hemiparkinsonian rat. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2009;34(2):340–50. Dostępne na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.02.002>
246. Akhondzadeh S, Jafari S, Raisi F, Nasehi AA, Ghoreishi A, Salehi B, i in. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: A double blind and placebo controlled trial. *Depress Anxiety* [Internet]. lipiec 2009 [cytowane 17 maj 2021];26(7):607–11. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19496103/>

247. Abbasi SH, Hosseini F, Modabbernia A, Ashrafi M, Akhondzadeh S. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: Randomized double-blind placebo-controlled study. *J Affect Disord* [Internet]. 10 grudzień 2012 [cytowane 17 maj 2021];141(2–3):308–14. Dostępna: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22516310/>

DOROBEK PUBLIKACYJNY DOKTORANTA

Pankiewicz, P*, Szybiński, M., Kisielewska, K., Gołębiowski, F., Krzemiński, P., Rutkowska-Włodarczyk, I., ... & Matłoka, M. (2021). Do small molecules activate the TrkB receptor in the same manner as BDNF? Limitations of published TrkB low molecular agonists and screening for novel TrkB orthosteric agonists. *Pharmaceuticals*, 14(8), 704.

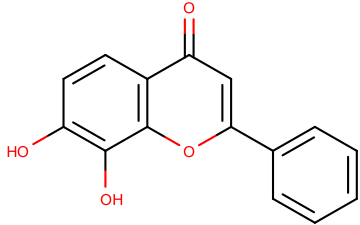
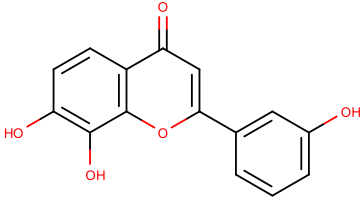
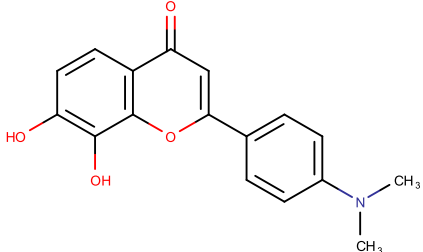
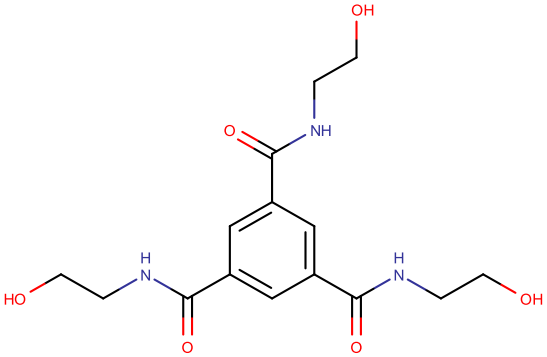
Matłoka, M., Janowska, S., Gajos-Draus, A., Ziółkowski, H., Janicka, M., Perko, P., Pankiewicz, P... & Pieczykolan, J. (2022). Esketamine inhaled as dry powder: Pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety assessment in a preclinical study. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 102127.

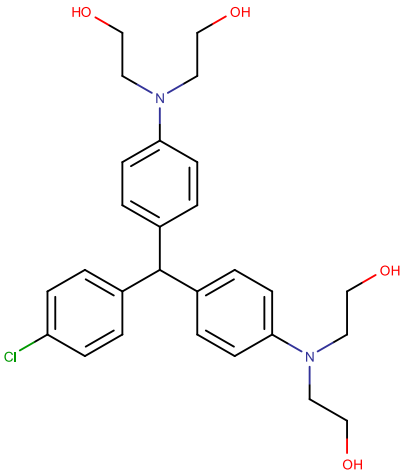
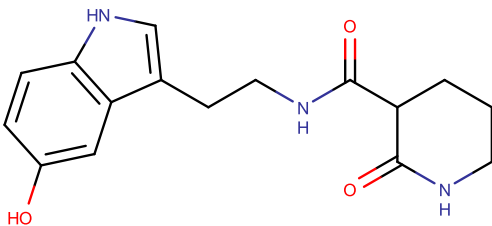
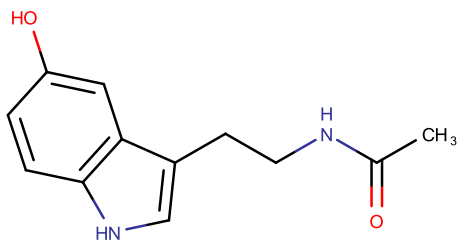
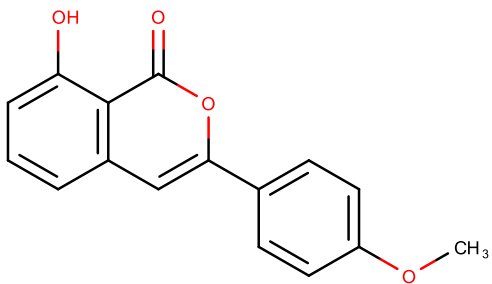
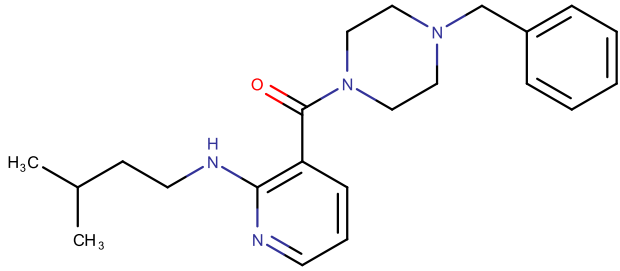
Depciuch, J., Sowa-Kućma, M., Misztak, P., Szewczyk, B., Nowak, G., Pankiewicz, P., & Parlińska-Wojtan, M. (2016). Olfactory bulbectomy-induced changes in phospholipids and protein profiles in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. A preliminary study using a FTIR spectroscopy. *Pharmacological Reports*, 68(3), 521-528.

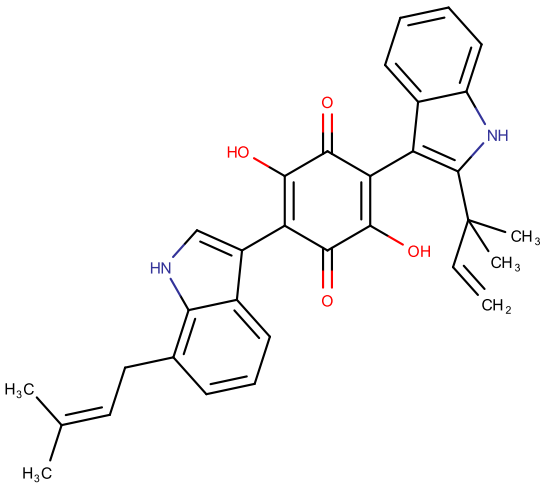
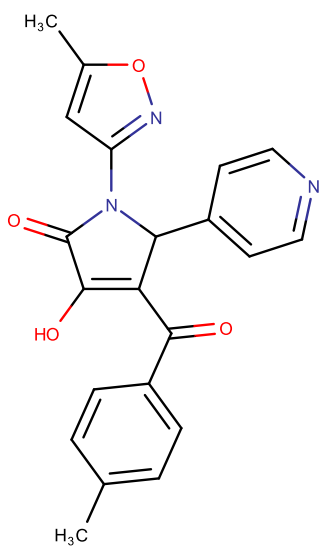
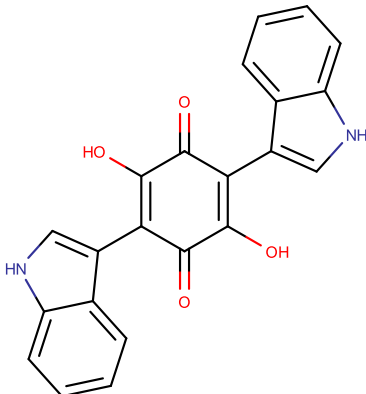
*- praca będąca przedmiotem rozprawy

ZAŁĄCZNIKI

Tabela Z1. Struktury chemiczne związków małowcząsteczkowych.

Nazwa związku	Struktura
7,8-dihydroksyflawon (7,8-DHF)	
7,8,3'-trihydroksyflawon (7,8,3'-THF)	
4'-dimetylamino-7,8-DHF (4'-DMA-7,8-DHF)	
GSB-106	[OH-Suc-Ser-Lys-NH-(CH ₂) ₃] ₂
LM22-A4	

LM22-B10	 <chem>OCCN(CCO)c1ccc(cc1)C(c2ccc(Cl)cc2)c3ccc(NCOC)cc3</chem>
HIOC	 <chem>Oc1ccc2c(c1)c[nH]2CCCN3C(=O)CCNC3=O</chem>
NAS	 <chem>Oc1ccc2c(c1)c[nH]2CCCN(C)C(=O)C</chem>
8-hydroksy-3-(4'-met-hoksyfenylo)-izokumaryna (Izokumaryna)	 <chem>Oc1ccc2c(c1)c(=O)oc3cc(OC)ccc32</chem>
NSI-189	 <chem>CC(C)CCNc1cccnc1C(=O)N2CCN(CC2)Cc3ccccc3</chem>

DMAQ-B1	 <p>The structure of DMAQ-B1 is a complex molecule featuring a central 1,4-dione ring. This ring is substituted with two hydroxyl groups (HO) at the 2 and 5 positions. At the 3 and 6 positions, it is substituted with two indole-3-yl groups. One of these indole rings is further substituted at its 2-position with a 2-methylbut-3-en-2-yl group, which consists of a central carbon atom bonded to two methyl groups (CH₃) and a prop-1-en-2-yl chain (CH₂).</p>
OSSK-495385	 <p>The structure of OSSK-495385 is a complex molecule featuring a central 1,4-dione ring. This ring is substituted with a hydroxyl group (HO) at the 2-position and a 4-methylphenyl group at the 3-position. At the 5-position, it is substituted with a pyridin-2-yl group. At the 6-position, it is substituted with a 5-methylisoxazol-3-yl group, which is a five-membered ring containing one oxygen and one nitrogen atom, with a methyl group (H₃C) at the 5-position.</p>
CPL503052 2,5-dihydroksy-3,6- bis(1H-indol-3- yl)cykloheksa-2,5- diene-1,4-dion	 <p>The structure of CPL503052 is a complex molecule featuring a central 1,4-dione ring. This ring is substituted with two hydroxyl groups (HO) at the 2 and 5 positions. At the 3 and 6 positions, it is substituted with two indole-3-yl groups.</p>

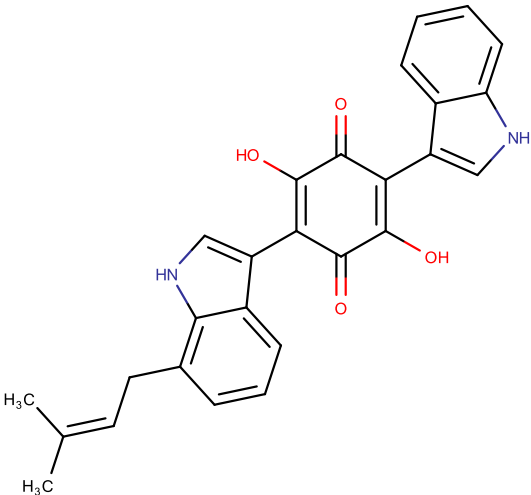
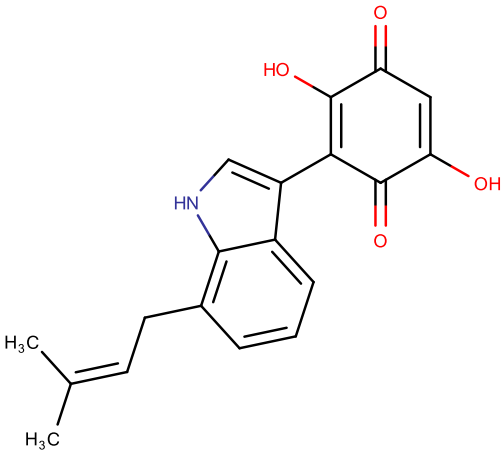
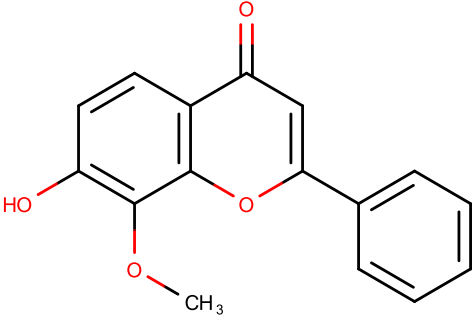
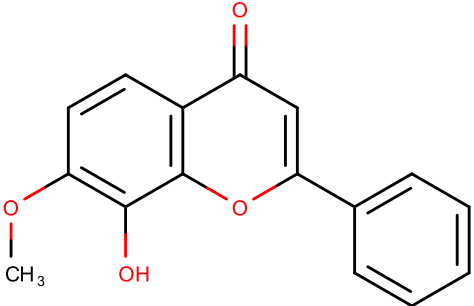
<p>CPL503071</p> <p>2,5-dihydroksy-3-(1H-indol-3-yl)-6-[7-(3-metylobut-2-en-1-yl)-1H-indol-3-yl]cycloheksaa-2,5-diene-1,4-dion</p>	
<p>CPL503113</p> <p>2,5-dihydroksy-3-[7-(3-metylobut-2-en-1-yl)-1H-indol-3-yl]cycloheksa-2,5-diene-1,4-dion</p>	
<p>7-hydroksy-8-metoksyflawon (7H8M-flawon)</p>	
<p>7-metoksy-8-hydroksyflawon (7M8H-flawon)</p>	

Tabela Z2. Wyznaczone wartości stałej dysocjacji (K_a) z użyciem mikroskalowej termoforezy kapilarnej. Wartość 0 oznacza brak oddziaływania.

Związek	K_a [μ M]	Związek	K_a [μ M]	Związek	K_a [μ M]
15770915	658	15771895	58	503-049-01	0
15770764	540	503-143-06	55	15770749	0
15770789	530	503-073-01	54,7	503-110-02	0
15772279	487	15772074	54	503-054-02	0
15772161	454	503-071-08 (MIX)	49,7	503-039-01	0
15770738	450	15771938	45	503-146-07	0
15772084	437	503-113-01	44,2	503-044-11	0
15770816	409	15772026	40	15772288	0
15770643	408	15772201	28,7	15770641	0
15772332	384	503-071-08	25	503-013-01	0
15770782	336	15772135	21,8	503-048-01	0
503-125-03	305	15772089	19,7	15770807	0
15772096	278	15772141	15,7	LM22-A4	0
15770817	268	15770805	12,6	503-119-01	0
15770808	254	15772080	10,4	503-070-01	0
15772002	226	DMAQ-B1	5,6	HIOC	0
15770916	207	15772115	5,4	15770832	0
15770892	194	15772254	5,3	15770835	0
15770722	189	15772271	4,81	15770806	0
15770644	164	503-104-02	4,235	NSI-189	0
15772674	149	503-112-01	3,8	503-125-04	0
503-144-01	148	503-052-03	2,6	15772780	0
15771979	137	OSK495385	2,32	15770845	0
503-132-07-04	137	503-072-06	1,6	GSB-106	0
15770706	136	7,8-DHF	1,3	503-133-01	0
15770919	128	15772293	0,512	503-091-01	0
15772181	128	15772236	0,054	503-023-02	0
15770778	119	7,8,3'-THF	0	15772131	0
15772812	109	503-109-01	0	15770879	0
503-021-01	97	503-025-02	0	4'-N,N-dimetylo-7,8-DHF	0
503-126-03	95	503-012-05	0	503-088-01	0
15772123	94	503-034-02	0	15770867	0
15772132	94	503-124-01	0	503-015-03	0
15772248	94	503-144-01	0	15770639	0
LM22-B10	83	15772188	0	503-016-04	0
15772068	78,9	503-089-01	0	Isocumarin	0
15772138	72,1	503-140-01	0	15770827	0
15770812	60	NAS	0		

Tabela Z3. Szczegółowe wyniki selektywności 7,8-DHF względem różnych celów molekularnych. 7,8- DHF w stężeniu 10 μ M został przebadany w panelu BioPrint® (badanie zewnętrzne, Eurofins). Eksperyment obejmował badanie wiązania 7,8-DHF z białkami należącymi do różnych rodzin w tym: receptory sprzężone z białkami G, transportery, kanały jonowe, receptory jądrowe, kinazy oraz enzymy niebędące kinazami. W tabeli zawarto szczegółowe wyniki dla każdego z analizowanych celów molekularnych. Wyniki prezentują % inhibicji wiązania specyficznego dla kontroli.

Cel molekularny	Badany charakter oddziaływania	Rodzina	% Inhibicji wiązania specyficznego dla związku kontroli	Związek kontrolny
μ (MOP)	Agonista	Receptor	-2	[³ H]DAMGO
5-HT transporter	Antagonista	Transporter	-4	[³ H]imipramine
5-HT1A	Agonista	Receptor	-26	[³ H]8-OH-DPAT
5-HT1B	Antagonista	Receptor	3	[³ H]GR125743
5-HT1D	Agonista	Receptor	-8	[³ H]serotonin
5-HT2A	Agonista	Receptor	-4	[¹²⁵ I](\pm)DOI
5-HT2B	Agonista	Receptor	50	[¹²⁵ I](\pm)DOI
5-HT2C	Agonista	Receptor	-4	[¹²⁵ I](\pm)DOI
5-HT3	Antagonista	Kanał jonowy	-2	[³ H]BRL 43694
5-HT4e	Antagonista	Receptor	-11	[³ H]GR 113808
5-HT6	Agonista	Receptor	-3	[³ H]LSD
5-HT7	Agonista	Receptor	4	[³ H]LSD
A1	Agonista	Receptor	99	[³ H]CCPA
A2A	Agonista	Receptor	75	[³ H]CGS
A2B	Antagonista	Receptor	78	[³ H]CPX
A3	Agonista	Receptor	68	[¹²⁵ I]AB-MECA
Abl kinaza	Inhibicja	Kinaza	25	ATP+Ulight-TK peptide
ACE	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	5	Abz-FRK(Dnp)-P-OH
ACE-2	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	-8	Mca-Tyr-Val-AlaAsp-Pro-Ala-Lys(DNP)-OH
Acetylocholinoesteraza	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	5	Acetylthiocholine
AMPA	Agonista	Kanał jonowy	7	[³ H]AMPA
APJ (apelina)	Agonista	Receptor	4	[¹²⁵ I](Glp ⁶⁵ , Nle ⁷⁵ , Tyr ⁷⁷)-apelin-13
AR	Agonista	Receptor	0	[³ H]methyltrienolone

AT1	Antagonista	Receptor	24	[¹²⁵ I][Sar ¹ ,Ile ⁸]-AT-II
AT2	Agonista	Receptor	6	[¹²⁵ I]CGP 42112A
ATPaza (Na ⁺ /K ⁺)	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	-2	ouabain
B2	Agonista	Receptor	-6	[³ H]bradykinin
BACE-1	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	15	Mca-S-E-V-N-L-D-A-E-F-R-K(Dnp)-R-R-NH ₂
BB3	Agonista	Receptor	11	[¹²⁵ I]Bn(6-14)
BZD	Agonista	Kanał jonowy	71	[³ H]flunitrazepam
Kanał Ca ²⁺	Antagonista (miejsce dla wera-pamilu)	Kanał jonowy	2	[³ H]nitrendipine
Kanał Ca _v 2	Antagonista	Kanał jonowy	-4	[³ H]diltiazem
Kanał Ca _v 2	Antagonista	Kanał jonowy	-6	[³ H]D888
Kanał Ca _v 2	Antagonista (diltiazem site)	Kanał jonowy	-15	[¹²⁵ I]ωconotoxin GVIA
CaMK2α	Inhibicja	Kinaza	-20	AIP
Kaspaza-3	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	1	benzyloxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC
CB1	Agonista	Receptor	1	[³ H]CP 55940
CB2	Agonista	Receptor	-3	[³ H]WIN 55212-2
CCK1	Agonista	Receptor	21	[¹²⁵ I]CCK-8s
CCK2 (CCKB)	Agonista	Receptor	15	[¹²⁵ I]CCK-8s
CCR2	Agonista	Receptor	4	[¹²⁵ I]MCP-1
CDK2	Inhibicja	Kinaza	0	ATP+Ulight-CFFKNIIVTPRTP PPSQ GK-amide
Transporter cholinowy (CHT1)	Antagonista	Transporter	5	[³ H]hemicholinium-3
Kanał Cl ⁻	Antagonista	Kanał jonowy	-7	[³⁵ S]TBPS
COX1	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	49	Arachidonic acid (3μM)+ADHP (25μM)/Diclofenac
COX2	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	82	Arachidonic acid (3 μM)+ADHP (25 μM) /NS398
CRF1	Agonista	Receptor	5	[¹²⁵ I]sauvagine
CysLT1 (LTD ₄)	Agonista	Receptor	-10	[³ H]LTD ₄
D1	Antagonista	Receptor	-4	[³ H]SCH 23390

D2S	Agonista	Receptor	-15	[³ H]7-OH-DPAT
D3	Antagonista	Receptor	2	[³ H]methylspiperone
Transporter dopaminy	Antagonista	Transporter	4	[³ H]BTCP
δ(DOP)	Agonista	Receptor	-5	[³ H]DADLE
EP2	Agonista	Receptor	2	[³ H]PGE ₂
ERK2	Inhibicja	Kinaza	-23	ATP+Ulight-CFFKNIVTPRTP PP SQGK-amide/staurosporine
Estrogen Era	Agonista	Receptor	7	[³ H]Estradiol
ETA	Agonista	Receptor	-10	[¹²⁵ I]endothelin-1
ETB	Agonista	Receptor	-26	[¹²⁵ I]endothelin-1
FLT-1 Kinaza	Inhibicja	Kinaza	17	ATP+Ulight-TK peptide (100 nM)
FP	Agonista	Receptor	6	[³ H]PGF _{2α}
Fyn Kinaza	Inhibicja	Kinaza	21	ATP+biotinyl-βAβAβAYQAE-ENTY-DEYEN/PP1
GABA transporter	Antagonista	Transporter	-2	[³ H]GABA (+10 μM isoguvacine) (+10 μM baclofen)
GABAA1 (h) (α1, β2, γ2)	Agonista	Receptor	12	[³ H]muscimol
GABAB(1b)	Antagonista	Receptor	-5	[³ H]CGP 54626
Glukagon	Agonista	Receptor	3	[¹²⁵ I]glucagon
Glycyna	Antagonista	Kanał jonowy	-1	[³ H]MDL 105,519
GR	Agonista	Receptor	-1	[³ H]dexamethasone
Cyklaza guanylowa	Efekt aktywatora		2	GTP (10 μM) (100 μM SNP for control)
H1	Antagonista	Receptor	-5	[³ H]pyrilamine
H2	Antagonista	Receptor	-37	[¹²⁵ I]APT
H3	Agonista	Receptor	-6	[³ H]N ^α -Mehistamine
H4	Agonista	Receptor	-4	[³ H]histamine
Proteaza HIV-1	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	1	antranilyl-HIV
Indukowalna NOS	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	3	L-arginine

IP (PGI ₂)	Agonista	Receptor	17	[³ H]iloprost
IRK	Inhibicja	Kinaza	12	ATP+Ulight-Poly GAT[EAY(1:1:1)] _n (50 nM)/ staurosporine
Kwas kainowy	Agonista	Kanał jonowy	26	[³ H]kainic acid
Kappa	Agonista	Receptor	3	[³ H]U69593
LXRβ	Agonista	Receptor	49	[³ H]T0901317
Lyn A Kinaza	Inhibicja	Kinaza	53	ATP+biotinyl-βAβAβ AKVEKI-GEGTYGVV YK/staurosporine
M1	Antagonista	Receptor	-4	[³ H]pirenzepine
M2	Antagonista	Receptor	-2	[³ H]AF-DX 384
M3	Antagonista	Receptor	-7	[³ H]4-DAMP
M4	Antagonista	Receptor	-5	[³ H]4-DAMP
MAO-A	Antagonista	Enzym niebędący kinazą	35	[³ H]Ro 41-1049
MC1	Agonista	Receptor	-5	[¹²⁵ I]NDP-α-MSH
MC3	Agonista	Receptor	-5	[¹²⁵ I]NDP-α-MSH
MC4	Agonista	Receptor	-5	[¹²⁵ I]NDP-α-MSH
MCH1	Agonista	Receptor	-12	[¹²⁵ I][Phe ¹³ , Tyr ¹⁹]-MCH
MMP-1	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	10	DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-AlaLys(n-Me-Abz)-NH ₂
MMP-2	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	56	NFF-2
MMP-9	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	72	NFF-2
Motylin	Agonista	Receptor	-2	[¹²⁵ I]motilin
MT1 (ML1A)	Agonista	Receptor	20	[¹²⁵ I]2-iodomelatonin
MT3 (ML2)	Agonista	Receptor	86	[¹²⁵ I]2-iodomelatonin
Mięśniowy receptor typu nikotynowego	Antagonista	Receptor	-20	[¹²⁵ I]α-bungarotoxin
Neuronalny receptor α4β2	Agonista	Receptor	5	[³ H]cytisine
Kanał Na ⁺	Antagonista	Kanał jonowy	-11	[³ H]batrachotoxin
NK1	Agonista	Receptor	11	[¹²⁵ I]-Substance P LYS3
NK2	Agonista	Receptor	-2	[¹²⁵ I]NKA

NMDA	Antagonista	Kanał jonowy	11	[³ H]CGP 39653
NOP (ORL1)	Agonista	Receptor	11	[³ H]nociceptin
Transporter norepinefryny	Antagonista	Transporter	-1	[³ H]nisoxetine
p38 α Kinaza	Inhibicja	Kinaza	-50	ATP + Ulight-CFFKNIVTPRTP PP SQGK-amide/ SB202190
PAF	Agonista	Receptor	-20	[³ H]C ₁₈ -PAF
PCP	Antagonista	Kanał jonowy	-3	[³ H]TCP
PDE2A1	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	5	[³ H]cAMP+ cAMP
PDE3B	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	11	[³ H]cAMP+ cAMP
PDE4D2	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	38	[³ H]cAMP+ cAMP
PDE5	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	48	[³ H]cAMP+ cAMP
PDE6	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	30	[³ H]cAMP+ cAMP
PPAR γ	Agonista	Receptor	21	[³ H]rosiglitazone
RAR α	Agonista	Receptor	-16	9-cis-Retinoic Acid [11,12-3H]
sigma	Agonista	Receptor	3	[³ H]DTG
Kanał SKCa	Antagonista	Kanał jonowy	4	[¹²⁵ I]apamin
sst1	Agonista	Receptor	2	[¹²⁵ I]Tyr11soma- tostatin-1 4
sst4	Agonista	Receptor	-23	[¹²⁵ I]Tyr11soma- tostatin-1 4
TNF- α	Agonista	Receptor	2	[¹²⁵ I]TNF- α
UT	Agonista	Receptor	-9	[¹²⁵ I]urotensin-II
V1a	Agonista	Receptor	-11	[³ H]AVP
V2	Agonista	Receptor	-2	[³ H]AVP
VPAC1	Agonista	Receptor	-13	[¹²⁵ I]VIP
Oksydaza ksantynowa	Inhibicja	Enzym niebędący kinazą	92	hypoxanthine
Y1	Agonista	Receptor	8	[¹²⁵ I]peptide YY
ZAP70 Kinaza	Inhibicja	Kinaza	4	ATP+biotinyl- β A β β ADEEEYFIPP/sta urosporine
α 1A	Antagonista	Receptor	2	[³ H]prazosin
α 1B	Antagonista	Receptor	-3	[³ H]prazosin
α 2A	Antagonista	Receptor	-5	[³ H]RX 821002

$\alpha 2B$	Antagonista	Receptor	-2	[³ H]RX 821002
$\alpha 2C$	Antagonista	Receptor	1	[³ H]RX 821002
$\beta 1$	Agonista	Receptor	-5	[³ H](-)CGP 12177
$\beta 2$	Antagonista	Receptor	-5	[³ H](-)CGP 12177
$\beta 3$	Antagonista	Receptor	-25	[¹²⁵ I] Cyanopin- dolol

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ

UCHWAŁA NR 10/2019

z dnia 26.02.2019 r.

Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 / art. 48 ust. 1 pkt. 2¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Badania farmakokinetyki innowacyjnych agonistów TrkB w rozwoju terapii chorób układu nerwowego ” z dnia 19.02.2018 r., złożonego przez **Uniwersytet Medyczny w Białymstoku Centrum Medycyny Doświadczalnej (0099)**, adres Marii Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok,² zaplanowanego przez **Joanna Hucz-Kalitowska**³, przy udziale⁴ (nie dotyczy) Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ⁵

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku 06/2019.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: **B, badania translacyjne lub stosowane, rodzaj: zaburzenia układu nerwowego i zaburzenia psychiczne u człowieka**
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: **łagodna**.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków⁶: **600 sztuk, mysz domowa (Mus musculus): szczep wsobny BALB/cmdb, samce, wiek 8-10 tygodni**.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: **Małgorzata Mackiewicz, Katarzyna Podłaszczyk, Agnieszka Popielska, Aneta Czeladko, Anna Maraszkiewicz, Julia Szewczyk, Elżbieta Emilia Łapińska, Ewelina Białous, Justyna Jeneralczuk, Iwona Ptaszyńska**.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁷ od **01.05.2019 do 31.12.2022**.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁸: **nie dotyczy**
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: **nie dotyczy**
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez, w sposób: **nie dotyczy**

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby;

³ imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

⁴ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁵ Niewłaściwy zapis usunąć

⁶ Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju

⁷ Nie dłużej niż 5 lat

⁸ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

9. Doświadczenie **nie zostanie**⁹ poddane ocenie retrospektywnej w terminie do ... miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

§ 3

Uzasadnienie: Po dokonaniu oceny wniosku zgodnie z art. 47 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) Lokalna Komisja Etyczna w Olsztynie stwierdza, że projekt nie budzi zastrzeżeń pod względem celowości jego wykonania, liczby użytych zwierząt oraz zasadności i klasyfikacji procedur objętych wnioskiem i wyraża zgodę na przeprowadzenie doświadczenia. Osobą odpowiedzialną za przeprowadzenie badań zgodnie z procedurami opisanymi we wniosku jest **Joanna Hucz-Kalitowska**.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie
LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 13/4

Podpis przewodniczącego komisji

PRZEWODNICZĄCY
Lokalne Komisji Etycznej
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
[Podpis]
prof. dr hab. Jerzy Juśkiewicz

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie; Zespół ds. dobrostanu.

⁹ Niewłaściwy zapis usunąć