

UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny



Aktywność ośrodkowa nowych arylopiperazynoalkilowych pochodnych salicylamidu

ROZPRAWA DOKTORSKA

ELŻBIETA ŻMUDZKA

PROMOTOR: Prof. dr hab. farm. JACEK SAPA
PROMOTOR POMOCNICZY: dr hab. farm. KAROLINA PYTKA

KRAKÓW 2020

Pragnę serdecznie podziękować
Panu Promotorowi Prof. dr hab. farm. Jackowi Sapie
za opiekę naukową,
cenne uwagi i wskazówki merytoryczne,
wyrozumiałość, życzliwość oraz poświęcony czas

Szczególnie serdecznie dziękuję
Pani dr hab. farm. Karolinie Pytce
za nieocenioną pomoc i niezliczony czas,
za przekazaną wiedzę i inspiracje,
za cierpliwość i wyrozumiałość,
za wsparcie i motywację,
za możliwość rozwoju
i bycie najlepszym mentorem

Serdecznie dziękuję
Panu Prof. dr hab. farm. Marcinowi Kołaczkowskiemu
i Pani dr inż. Jolancie Jaśkowskiej
za syntezę badanych związków

Pani Prof. dr hab. farm. Annie Wesółskiej
za umożliwienie przeprowadzenia części doświadczeń

Panu Prof. dr hab. n.med. Pawłowi Mierzejewskiemu
za możliwość wykonania części badań poszerzonych

Pani dr Agacie Siwek
za wykonanie badań powinowactwa receptorowego

Pani mgr Monice Gluch-Lutwin oraz Pani mgr Barbarze Mordyl
za przeprowadzenie badań aktywności wewnętrznej

*Bardzo dziękuję
całemu Zespołowi Katedry Farmakodynamiki
oraz Zakładu Wstępnych Badań Farmakologicznych,
za życzliwość i okazaną pomoc*

*Dziękuję szczególnie
moim wspaniałym **Rodzicom, Rodzeństwu** i kochanemu **Mężowi**,
bez których powstanie tej pracy nie byłoby możliwe*

Dla mojego Męża i najwspanialszych Dzieci

*„To nie to, co masz, ani to, kim jesteś, ani to, gdzie jesteś,
ani co robisz czyni cię szczęśliwym bądź nieszczęśliwym.
Chodzi o to, o czym myślisz...”*

Dale Carnegie

Spis treści

<i>Spis treści</i>	9
<i>Wykaz skrótów i akronimów</i>	14
1 Wstęp	16
1.1 Wprowadzenie	16
1.2 Schizofrenia	17
1.3 Etiopatogeneza schizofrenii	19
1.4 Leczenie schizofrenii	25
1.5 Schizofrenia i zaburzenia depresyjne	32
1.6 Schizofrenia i zaburzenia lękowe	34
1.7 Schizofrenia i zaburzenia kognitywne	35
1.8 Schizofrenia i zaburzenia układu sercowo – naczyniowego	36
1.9 Podsumowanie	38
2 Cel	40
3 Materiały	42
3.1 Badane związki	42
3.2 Związki odniesienia	46
3.3 Leki i odczynniki	46
3.4 Zwierzęta	48
3.5 Aparatura	48
3.6 Obliczenia statystyczne.....	49
4 Metody	51
4.1 Badania wstępne	51
Badania <i>in vitro</i>	51

4.1.1	Badanie powinowactwa do receptorów dopaminergicznych D_2 , serotoninergicznych $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$, $5-HT_6$, $5-HT_7$ oraz adrenergicznych α_1 i α_2	51
4.1.2	Badanie aktywności wewnętrznej wobec receptorów dopaminergicznych D_2 oraz serotoninergicznych $5-HT_{1A}$ i $5-HT_{2A}$	53
4.1.3	Badanie aktywności wewnętrznej wobec receptorów serotoninergicznych $5-HT_7$	54
Badania <i>in vivo</i>		55
4.1.4	Ocena potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 u myszy	55
4.1.5	Ocena potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem amfetaminy u myszy	56
4.1.6	Ocena potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej w teście wymuszonego pływania u myszy	57
4.1.7	Ocena potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej w teście zawieszania za ogon u myszy	57
4.1.8	Ocena potencjalnej aktywności przeciwlękowej w teście czterech płytek u myszy	58
4.1.9	Ocena potencjalnej aktywności przeciwlękowej w teście uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy	59
4.1.10	Ocena wpływu badanych związków na ruchliwość spontaniczną u myszy	59
4.1.11	Ocena wpływu badanych związków na zdolność indukowania katalepsji u myszy	60
4.1.12	Ocena wpływu badanych związków na koordynację ruchową myszy w teście rotarod	61
Badania weryfikujące wpływ na układ sercowo-naczyniowy		61
4.1.13	Ocena wpływu na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnych szczurów	61
4.1.14	Ocena wpływu na presyjne działanie metoksaminy	62
4.1.15	Ocena wpływu na prawidłowy elektrokardiogram u szczurów	62
4.2	Rozszerzone badania farmakologiczne dla wyselekcjonowanych związków: JJGW07 i JJGW08	63

4.2.1	Ocena potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów.....	63
4.2.2	Ocena potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście bramkowania przedsygnałowego po podaniu MK-801 u szczurów.....	64
4.2.3	Ocena potencjalnej aktywności przeciwłękowej w teście zagrzebywania u myszy.....	66
4.2.4	Ocena wpływu na funkcje kognitywne w teście biernego unikania u myszy.....	66
4.2.5	Ocena wpływu na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście biernego unikania u myszy	67
4.2.6	Ocena wpływu na funkcje kognitywne w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy.....	68
4.2.7	Ocena wpływu na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy.....	68
5	Wyniki.....	70
5.1	Badania wstępne	70
	Badania <i>in vitro</i>	70
5.1.1	Powinowactwo do receptorów dopaminergicznych D ₂ , serotonergicznym 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} , 5-HT ₆ i 5-HT ₇ oraz adrenergicznych α ₁ i α ₂	70
5.1.2	Aktywność wewnętrzna wobec receptorów dopaminergicznych D ₂	72
5.1.3	Aktywność wewnętrzna wobec receptorów serotonergicznym 5-HT _{1A} .	73
5.1.4	Aktywność wewnętrzna wobec receptorów serotonergicznym 5-HT _{2A} .	74
5.1.5	Aktywność wewnętrzna wobec receptorów serotonergicznym 5-HT ₇ ...	75
	Badania <i>in vivo</i>	76
5.1.6	Potencjalna aktywność przeciwpsychotyczna w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 u myszy.....	76
5.1.7	Potencjalna aktywność przeciwpsychotyczna w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem amfetaminy u myszy	79
5.1.8	Potencjalna aktywność przeciwdepresyjna w teście wymuszonego pływania u myszy.....	81

5.1.9	Potencjalna aktywność przeciwdepresyjna w teście zawieszania za ogon u myszy	83
5.1.10	Potencjalna aktywność przeciwłękowa w teście czterech płytek u myszy.....	85
5.1.11	Potencjalna aktywność przeciwłękowa w teście uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy	87
5.1.12	Wpływ badanych związków na ruchliwość spontaniczną u myszy	89
5.1.13	Wpływ badanych związków na zdolność indukowania katalepsji u myszy.....	93
5.1.14	Wpływ badanych związków na koordynację ruchową myszy w teście rotarod.....	93
Badania weryfikujące wpływ na układ sercowo-naczyniowy		95
5.1.15	Wpływ na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnych szczurów	95
5.1.16	Wpływ na presyjne działanie metoksaminy	99
5.1.17	Wpływ na prawidłowy elektrokardiogram u szczurów	101
5.2	Rozszerzone badania farmakologiczne dla wyselekcjonowanych związków: JJGW07 i JJGW08.	103
5.2.1	Potencjalna aktywność przeciwpsychotyczna w teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów.....	103
5.2.2	Potencjalna aktywność przeciwpsychotyczna w teście bramkowania przed sygnałowego po podaniu MK-801 u szczurów.....	105
5.2.3	Potencjalna aktywność przeciwłękowa w teście zagrzebywania u myszy.....	109
5.2.4	Wpływ na funkcje kognitywne w teście biernego unikania u myszy.....	111
5.2.5	Wpływ na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście biernego unikania u myszy.....	113
5.2.6	Wpływ na funkcje kognitywne w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy	115
5.2.7	Wpływ na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy.....	117
6	Dyskusja	119
7	Wnioski.....	143
Streszczenie		145

<i>Summary</i>	148
<i>Bibliografia</i>	151
<i>Spis tabel</i>	190
<i>Spis rycin</i>	192

Wykaz skrótów i akronimów

- 8-OH-DPAT – 8-hydroksy-2-(di-n-propyloamino)tetralina
- cAMP - 3',5'-cykliczny adenozynomonofosforan
- CBT – (ang. *Cognitive Behavioral Therapy*), Psychoterapia Poznawczo – Behawioralna
- CRE - (ang. *cAMP responsive element*), element odpowiedzi na cAMP
- COX-2 – cyklooksygenaza 2
- DALY - (ang. *disability adjusted life-years*), lata życia skorygowane niepełnosprawnością
- DBP - (ang. *diastolic blood pressure*), ciśnienie rozkurczowe krwi
- DMSO - dimetylosulfotlenek
- DSM-5 – Diagnostyczny i Statystyczny Podręcznik Zaburzeń Psychiczych, wydanie piąte
- EDTA – kwas wersenowy
- EKG – elektrokardiogram
- FDA – (ang. *Food and Drug Administration*), Agencja Żywności i Leków
- FST - (ang. *forced swimming test*), test wymuszonego pływania, test Porsolt'a
- GABA - kwas γ -aminomasłowy
- HR – (ang. *heart rate*), częstotliwość pracy serca
- ICD-10 – (ang. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych
- IL-1 β – interleukina 1 beta
- IL-6 – interleukina 6
- IL-8 – interleukina 8
- IFN- γ – interferon gamma
- i.p.* – podanie dootrzewnowe
- i.v.* – podanie dożylnie
- LCAPs – (ang. *Long-Chain Arylpiperazines*), długołańcuchowe arylopiiperazyny
- LSD – dietyloamid kwasu lizergowego
- ME - metoksamina
- mGluR – (ang. *metabotropic glutamate receptor*), metabotropowy receptor glutaminianu

MK-801 - dizocylpina

MTA – (ang. *multi-target agent*) - lek oddziałujący równocześnie na wiele celów biologicznych

NMDA - N-metylo-D-asparaginian

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PPI – (ang. *prepulse inhibition*), bramkowanie przedsygnalowe

QTc – kalkulowany odstęp QT

SBP - (ang. *systolic blood pressure*), ciśnienie skurczowe krwi

TNF- α - (ang. *tumor necrosis factor-alpha*), czynnik martwicy nowotworów alfa

TST - (ang. *tail suspension test*), test zawieszania za ogon

s.c. – podanie podskórne

VMAT-2 – (ang. *vesicular monoamine transporter 2*), pęcherzykowy transporter monoaminowy-2

VTA – jądro brzuszne nakrywki

1 Wstęp

1.1 Wprowadzenie

Zaburzenia psychotyczne, często określane mianem „stanu psychotycznego” lub „psychozy”, to chorobowy stan umysłu, charakteryzujący się silnymi zaburzeniami w ocenie, odbiorze i postrzeganiu rzeczywistości [1]. Jednymi z najczęściej występujących są zaburzenia schizofreniczne i schizofrenia. Historycznie różne rodzaje schizofrenii określano jako otępienie wczesne tj. „*dementia praecox*” [2]. Natomiast schizofrenię jako jednostkę chorobową opisał po raz pierwszy w 1911 roku Paul Eugen Bleuler, szwajcarski lekarz psychiatra, w swojej pracy: „*Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*” [3]. Samo pojęcie schizofrenia pochodzi z greckiego: „*schizein*”-rozszczyć i „*phren*”-umysł, oznaczając dosłownie rozszczepienie umysłu [4], jednak co ważne, dotyczy ono rozszczepienia pomiędzy myśleniem, zachowaniem i emocjami pacjenta, a nie rozszczepienia osobowości.

Skuteczne leczenie pierwszego epizodu schizofrenii ma kluczowe znaczenie dla zminimalizowania problemów w funkcjonowaniu społecznym i zawodowym [5]. Obecnie dzięki efektywnej terapii wielu pacjentów cierpiących na schizofrenię nie wymaga hospitalizacji i może prowadzić ustabilizowany tryb życia, zarówno rodzinnego jak i zawodowego. Rokowania pacjentów wciąż jednak pozostają nieprzewidywalne [6]. Badania wskazują, że tylko około 20% pacjentów reaguje pozytywnie na leczenie [7]. U pozostałych chorych obserwuje się liczne epizody psychotyczne, przewlekłe objawy oraz słabą odpowiedź na zastosowane leki przeciwpsychotyczne [6]. Co więcej, psychozie bardzo często towarzyszą dodatkowe schorzenia, takie jak: depresja i lęk oraz zaburzenia poznawcze, które nieodłącznie powiązane są z kształtowaniem i utrzymywaniem się objawów psychotycznych [8]. Warto podkreślić, że coraz częściej w postępowaniu terapeutycznym różnych zaburzeń, szczególnie dotyczących ośrodkowego układu nerwowego, zwraca się uwagę na poprawę jakości życia. Dlatego niezmiernie ważne jest poszukiwanie nowych leków, które pozwoliłyby na skuteczną i bezpieczną terapię schizofrenii oraz schorzeń współtowarzyszących, w tym zaburzeń poznawczych, depresji i lęku.

1.2 Schizofrenia

Schizofrenia jest schorzeniem przewlekłym, często skazującym chorych na izolację, ze względu na istotne pogorszenie funkcjonowania emocjonalnego i społecznego. Może rozwijać się nagle, dając gwałtowne objawy w ciągu kilku dni lub też stopniowo przez kilka miesięcy, a nawet lat. Obecnie schizofrenia występuje u około 1% populacji ludzkiej, będąc jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności społeczeństwa [9,10]. Co więcej, najczęściej dotyka ludzi młodych, między 15 a 35 rokiem życia, zarówno kobiety jak i mężczyzn, przy czym jej objawy pojawiają się we wcześniejszym wieku u mężczyzn niż u kobiet [11]. Choroba ta związana jest także ze zwiększonym ryzykiem samobójstw, które obserwuje się u około 10% pacjentów. Dodatkowo, wśród pacjentów cierpiących na schizofrenię bardzo często dochodzi do nadużywania różnego rodzaju substancji, takich jak: tytoń, alkohol czy leki na receptę [7,12]. Powszechny jest również ogólny brak świadomości swojej choroby, co skutkuje słabszym funkcjonowaniem psychospołecznym, nawrotami i gorszym przebiegiem choroby, czy też brakiem współpracy w leczeniu [6,7].

Schizofrenia charakteryzuje się szeregiem objawów klinicznych, z czego głównie wymienia się: objawy pozytywne (tzw. wytwórcze), będące dodatkowymi w stosunku do naturalnego zachowania oraz objawy negatywne, które pogarszają normalne funkcjonowanie (Tab.1.1). Według najnowszej klasyfikacji, wyróżnia się także bardzo niespecyficzne objawy poznawcze, związane z upośledzeniem pamięci i intelektu [7,12]. Do czterech podstawowych, tzw. osiowych objawów opisanych pierwotnie przez Bleulera (określanych jako „4A”) zaliczamy: autyzm, ambiwalencję, zaburzenia afektu i zaburzenia asocjacji [13,14]. Wśród objawów dodatkowych Bleuler wyliczył także: urojenia, złudzenia i omamy, objawy katatoniczne, zmiany cech osobowości, zmiany mowy czy pisma, a także zaburzenia pamięci, zachowania depresyjne czy maniakalne. Chory unika kontaktu z innymi ludźmi, staje się podejrzliwy i nieufny, znacznie ogranicza dotychczasową aktywność i zachowuje się nieadekwatnie do sytuacji [14]. Z drugiej strony, psychiatra Kurt Schneider opisał listę tzw. „objawów schneiderowskich”, nazywanych także „objawami pierwszorzędowymi”, które mają odróżnić schizofrenię od innych zaburzeń psychotycznych [15]. Wyróżnia się wśród nich między innymi: urojenia kontrolowania

przez siły zewnętrzne, głosy komentujące myśli lub działania chorego, czy też głosy dyskutujące z myślami chorego lub innymi głosami [15].

Jak już wspomiano, nieodłącznym objawem w psychozie schizofrenicznej są także zaburzenia afektu i funkcji poznawczych oraz towarzyszący lęk, panika, zaburzenia obsesyjno-kompulsywne, czy też poczucie zagrożenia zdrowia oraz życia, które dodatkowo mogą nasilać chorobę [7,12]. Objawy depresyjne i lękowe oraz upośledzenie pamięci i koncentracji w znacznym stopniu utrudniają pacjentom funkcjonowanie, a ich właściwa diagnoza i leczenie stanowią jedno z poważniejszych wyzwań współczesnej medycyny.

Tab. 1.1 Objawy schizofrenii [7,16]

objawy pozytywne	objawy negatywne	objawy poznawcze
halucynacje (omamy)	apatia	dezorganizacja mowy, myśli i uwagi
urojenia	anhedonia	trudności w komunikacji interpersonalnej
nieprawidłowe zachowania motoryczne	alogia (zubożenie mowy)	zaburzenia aktywności społecznej (rodzinnej, zawodowej itp.)
	abulia (niechęć do działania)	
	awolicja (brak woli)	
	aspontaniczność	
	zubożenie mimiki	
	spowolnienie ruchowe	

Zgodnie z klasyfikacją ICD-10 opisanych jest kilka rodzajów schizofrenii, różniących się między sobą przede wszystkim: rodzajem objawów i stopniem ich nasilenia (Tab.1.2). Samo rozpoznanie schizofrenii osiąga się poprzez wnikliwą ocenę objawów choroby i czasu ich trwania. Według DSM-5 (Diagnostyczny i Statystyczny Podręcznik Zaburzeń Psychiczych, wydanie piąte) koniecznym do zdiagnozowania choroby jest występowanie przez co najmniej miesiąc, dwóch lub więcej objawów z fazy aktywnej takich jak np.: urojenia, halucynacje, dezorganizacja mowy, zachowanie katatoniczne czy objawy negatywne [7]. Dodatkowo, objawy schizofrenii muszą występować przez co najmniej sześć miesięcy, a u pacjenta konieczne jest zaobserwowanie obniżonego poziomu funkcjonowania w zakresie pracy czy relacji interpersonalnych [7]. Kompleksowa diagnostyka różnicowa schizofrenii jest niezbędna i konieczna, by odróżnić to zaburzenie od innych stanów psychotycznych, jak np.:

zaburzenie schizoafektywne, zaburzenie depresyjne z cechami psychotycznymi, czy też zaburzenie dwubiegunowe z cechami psychotycznymi.

Tab. 1.2 Klasyfikacja schizofrenii według ICD-10 [17]

Typ	Objawy
F20.0 Schizofrenia paranoidalna	względnie stabilne, często paranoidalne urojenia, którym zwykle towarzyszą halucynacje, zwłaszcza słuchowe i zaburzenia percepcyjne; zaburzenia afektu, woli i mowy oraz objawy katatoniczne są słabo nasilone
F20.1 Schizofrenia hebefreniczna	zmiany afektywne są wyraźne, urojenia i halucynacje ulotne i fragmentaryczne, zachowanie nieodpowiedzialne i nieprzewidywalne; liczne manieryzmy; nastrój płytki i niedostosowany, myśli zdezorganizowane a mowa niespójna; istnieje tendencja do izolacji społecznej
F20.2 Schizofrenia katatoniczna	dominują znaczące zaburzenia psychoruchowe od hiperkinezy po otępienie, automatyczne posłuszeństwo i negatywizm; epizody gwałtownego podniecenia; zjawiska katatoniczne można łączyć ze stanem przypominającym sen z żywymi halucynacjami scenicznymi
F20.3 Schizofrenia nieróznicowana (atypowa)	stany psychotyczne spełniające ogólne kryteria diagnostyczne dla schizofrenii, ale nie spełniające żadnego z opisanych powyżej, lub wykazujące cechy więcej niż jednego z nich bez wyraźnej przewagi konkretnego zestawu cech diagnostycznych
F20.4 Depresja postschizofreniczna	epizod depresyjny, często wydłużony, powstały w następstwie choroby schizofrenicznej; objawy schizofrenii, pozytywne lub negatywne nadal muszą być obecne, ale nie dominują w obrazie klinicznym
F20.5 Schizofrenia rezydualna	przewlekły etap zaburzeń schizofrenicznych, w którym nastąpił wyraźny postęp od wczesnego stadium do późniejszego etapu, charakteryzującego się długotrwałymi choć nie zawsze odwracalnymi objawami negatywnymi
F20.6 Schizofrenia prosta	postępujący rozwój dziwaczności zachowania, niezdolność do spełniania wymagań społecznych, spadek wydajności; objawy negatywne rozwijają się bez poprzedzania jawnymi objawami psychotycznymi
F20.8 Schizofrenia innego rodzaju	zaburzenia o przebiegu schizopodobnym
F20.9 Schizofrenia nieokreślona	inne zaburzenia na tle psychotycznym nie dające się sklasyfikować do powyższych typów

1.3 Etiopatogeneza schizofrenii

Pomimo wielu przeprowadzonych badań, przyczyny schizofrenii wciąż nie są do końca poznane. Ze względu na zaobserwowane u pacjentów zmiany w funkcjonowaniu neuronów i neuroprzebieżników w ośrodkowym układzie nerwowym dziś (tylko

w oficjalnych pismach) określa się ją jako „chorobę mózgu”. Większość teorii dotyczących zaburzeń równowagi neurochemicznej w schizofrenii skupia się na nadmiarze lub niedoborze neuroprzekaźników takich jak: dopamina, serotonina, glutaminian, czy też kwas γ -aminomasłowy (GABA), ale wciąż badane są nowe możliwe przyczyny leżące u źródła choroby [18]. Obecnie, badania naukowców dotyczące zaburzeń psychicznych przyjmują formę tzw. podejścia sieciowego, a więc całościowego spojrzenia na chorobę, jako jednostkę złożoną, którą można opisać poprzez skomplikowane sieci oddziaływań między białkami i cząsteczkami sygnałowymi [19,20].

Podstawą badań i leczenia schizofrenii jest hipoteza dopaminergiczna i zaburzenia w neurotransmisji dopaminy [21]. Szczególnie zwraca się uwagę na nieprawidłowości w funkcjonowaniu receptorów dopaminergicznych D_2 oraz cztery główne szlaki dopaminergiczne: nigrostriatalny, mezolimbiczny, mezokortykalny i guzowo-lejkowy [22,23]. Nadmiar dopaminy w szlaku mezolimbicznym (od jądra brzusznej nakrywki (VTA) do obszarów limbicznych) może odpowiadać za objawy pozytywne schizofrenii [18]. Natomiast niskie poziomy dopaminy w szlaku mezokortykalnym (od VTA do kory mózgowej) mogą wywoływać objawy negatywne i deficyty poznawcze [22,23]. Dodatkowo, na skutek leczenia przeciwpsychotycznego, obserwuje się obniżony poziom dopaminy w szlaku nigrostriatalnym (od istoty czarnej do jądra ogoniastego), co wiąże się z pozapiramidowymi objawami motorycznymi, takimi jak: drżenia mięśniowe, bradykineza czy sztywność mięśni [18], a także spadek dopaminy w szlaku guzowo-lejkowym (od podwzgórza do przysadki mózgowej), co skutkuje podwyższonym poziomem prolaktyny i w efekcie spadkiem libido, mlekotokiem i wtórnym brakiem miesiączki [22,23]. Obecnie przyjęta i zmodyfikowana hipoteza dopaminergiczna wskazuje na istotność mezolimbicznej neurotransmisji dopaminergicznej i jej wpływ na procesy decyzyjne oraz funkcjonowanie [21,24].

Rozwój hipotezy serotoninowej w schizofrenii związany jest z doniesieniem na temat dietyloamidu kwasu lizergowego (LSD), nasilającego działanie serotoniny w mózgu [18]. LSD, będący agonistą receptorów serotoninergicznych $5-HT_{2A}$, jest jedną z najsilniejszych substancji psychoaktywnych i halucynogennych. Okazuje się, że nowsze leki neuroleptyczne, które poza blokadą receptorów dopaminergicznych, blokują również receptory serotoninergiczne, są bardziej skuteczne w łagodzeniu objawów pozytywnych i negatywnych schizofrenii [18]. Można także przypuszczać, że zwiększona transmisja serotoninergiczna z grzbietowej części jądra szwu na skutek

stresu zaburza aktywność neuronów korowych w schizofrenii [25]. Dodatkowo, długotrwałe nadmierne obciążenie serotonergiczne wywołane stresem w korze mózgowej w schizofrenii, w szczególności w przedniej korze obręczy i grzbietowo boczny płacie czołowym, może być główną przyczyną tego zaburzenia [26].

Inną teorią leżącą u podstaw rozwoju schizofrenii jest udział glutaminianu, głównego neuroprzekaźnika pobudzającego w mózgu i hipofunkcja receptorów glutaminergicznych (NMDA, N-metylo-D-asparagianu) [27]. Hipoteza ta, zakłada przede wszystkim zmniejszenie kontroli receptora NMDA nad hamującymi neuronami GABA-ergicznymi [28]. Hipofunkcja receptorów NMDA może prowadzić do zmian morfologicznych i strukturalnych w obszarach mózgu, które są odpowiedzialne za rozwój psychozy [29,30]. Zmiany w pobudzaniu neuronów GABA-ergicznych za pośrednictwem receptora NMDA sugerują, że schizofrenia jest powiązana z zaburzeniami układu glutaminergicznego, przede wszystkim w korze przedczołowej i limbicznych obszarach mózgu. Badania pokazują, że niekompetyjni antagoniści receptora NMDA, tj. fencyklidyna i ketamina wywołują objawy podobne do tych, które towarzyszą schizofrenii [31]. Dodatkowo, dostępne dane sugerują, iż brak aktywności receptorów NMDA w regulacji mezkortykalnych neuronów dopaminergicznych związany jest z występowaniem objawów negatywnych, afektywnych i poznawczych w schizofrenii [32]. Badania *post-mortem* u osób cierpiących na schizofrenię, wskazują na zmiany zarówno w gęstości receptorów glutaminergicznych, jak i w składzie ich podjednostek w korze przedczołowej, wzgórzu i płacie skroniowym [33–35]. Zaobserwowano także podwyższony poziom glutaminianu u pacjentów ze schizofrenią prodromalną i we wczesnym stadium choroby, w porównaniu do grupy kontrolnej [32]. Co ciekawe, w próbach terapeutycznych substancje zwiększające transmisję receptora NMDA łagodziły niektóre objawy u pacjentów ze schizofrenią [35], potwierdzając udział układu glutaminergicznego w chorobie.

Z drugiej strony, w patogenezie choroby uwzględnia się również zaangażowanie kwasu γ -aminomasłowego, głównego neurotransmitera hamującego w ośrodkowym układzie nerwowym [36]. Interneurony GABA-ergiczne mają bowiem kluczowe znaczenie dla synchronizacji i oscylacji aktywności neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania poznawczego, percepcji oraz pamięci [37]. Jednym z istotnych czynników w patomechanizmie schizofrenii mogą być zaburzenia sygnalizacyjne GABA, które powodują brak równowagi pomiędzy pobudzeniem, a hamowaniem w korze mózgowej [38,39]. Po raz pierwszy

udział GABA w schizofrenii wskazał Eugen Roberts w 1972 roku, sugerując, że może on hamować sygnalizację dopaminergiczną [40]. Kolejne doniesienia nie potwierdziły jednak tej hipotezy, wykazując, że w niektórych modelach GABA może mieć niekorzystny wpływ na aktywność dopaminy w schizofrenii [40].

Podobnie wciąż badany jest udział receptorów α -adrenergicznych i noradrenaliny w patogenezie choroby [41,42]. Objawy pozytywne w schizofrenii mogą być łagodzone dzięki blokowaniu receptorów adrenergicznych α_1 , a objawy negatywne i poznawcze są redukowane przy użyciu antagonistów receptorów adrenergicznych α_2 [43]. Przykładowo, johimbina, będąca selektywnym pośrednim agonistą receptorów adrenergicznych α_2 , powoduje nasilenie objawów pozytywnych, natomiast funkcjonalny antagonist, klonidyna łagodzi te objawy [41]. Co istotne, terapia wspomagająca, w której stosuje się leki przeciwdepresyjne, modulujące receptory adrenergiczne (jak np. duloksetyna), może także łagodzić objawy negatywne choroby [44]. Jeden z najważniejszych atypowych neuroleptyków, kłozapina, charakteryzuje się złożonym mechanizmem działania, w tym określa się ją również jako antagonistę receptorów adrenergicznych α_1 , z wyższym powinowactwem do tych receptorów niż do dopaminergicznych D_2 oraz równocześnie antagonistę receptorów adrenergicznych α_2 [45]. Co ciekawe, kłozapina podawana szczurom powoduje zwiększenie gęstości ośrodkowych receptorów adrenergicznych α_1 w korze i wzgórzu, przyczyniając się tym samym do poprawy zaburzeń poznawczych i deficytów bramkowania czuciowo-ruchowego obserwowanych w schizofrenii [46]. Potwierdza to istotną rolę antagonistów receptorów adrenergicznych α_1 w leczeniu psychoz oraz unikalny mechanizm działania przeciwpsychotycznego kłozapiny. Inny, najnowszy z neuroleptyków III generacji, brekspiprazol, moduluje zarówno transmisję dopaminergiczną jak i serotonergiczną (częściowy agonista receptorów serotonergicznych 5-HT_{1A} i dopaminergicznych D_2), a dodatkowo jest antagonistą receptorów adrenergicznych $\alpha_{1B/2C}$ [47], wysoce skutecznym w leczeniu schizofrenii [48]. Zaangażowanie układu adrenergicznego w patogenezę schizofrenii sugerują również przeprowadzone analizy biomarkerów, które wskazują, że podwyższony poziom noradrenaliny może być związany z halucynacjami, dezorganizacją poznawczą, słabą kontrolą impulsów, czy też podejrzliwością [49]. Dodatkowo, manipulowanie poziomem noradrenaliny może mieć wpływ na objawy pozytywne schizofrenii [50,51]. Badania *post-mortem* wskazują jednak na różne poziomy noradrenaliny w mózгах pacjentów cierpiących na schizofrenię, w zależności od populacji [41]. Dostępne

obecnie dane nie pozwalają więc na jednoznaczne stwierdzenia i konieczne są dalsze badania w tym kierunku, jednak można ogólnie stwierdzić, że noradrenalina, receptory α -adrenergiczne i leki działające za ich pośrednictwem odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu kognitywnym i w systemie wartościowania, powiązanych zarówno ze schizofrenią jak i z depresją [42].

Okazuje się, że rozwój schizofrenii może być także związany z zaburzeniami układu immunologicznego [52]. Szczególnie zwraca się uwagę na cytokiny: IL-1 β i IL-6, które mają istotny wpływ na rozwój układów neuroprzekaźników ważnych w chorobie [52]. Badania wskazują, że ekspozycja na infekcje w okresie prenatalnym lub okołoporodowym przyczynia się do rozwoju schizofrenii, nie tylko w modelach zwierzęcych [53,54]. U ludzi czynnikami ryzyka w rozwoju choroby u potomstwa są przykładowo: przebyte infekcje dróg oddechowych [55,56], narządów płciowych, dróg rodnych [56,57], czy też zakażenie *Toksoplasma gondii* [58]. Także podwyższony poziom IL-8 u kobiet podczas ciąży zwiększa ryzyko schizofrenii u potomstwa [59] i jest związany ze zmianami w objętości struktur mózgowych [60]. Wpływ ciężkich infekcji i zaburzeń autoimmunologicznych na rozwój schizofrenii potwierdza również duże badanie epidemiologiczne przeprowadzone u chorych pacjentów [61]. W patogenezie choroby uwzględnia się zaburzenia równowagi różnych układów odpornościowych, takich jak: układ wrodzony (makrofagi, monocyty), układy pro- i przeciwzapalne, a także odporność typu 1 i 2 [62,63]. Co więcej, obserwuje się podwyższone poziomy czynników prozapalnych we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów ze schizofrenią. Szczególnie wyróżnia się tutaj cytokiny prozapalne: IL-6, IFN- γ i TNF- α [64]. Zaangażowanie zapalenia w rozwój choroby potwierdzają także efekty uzyskane w wyniku leczenia środkami przeciwzapalnymi. Przykładowo, połączenie terapii risperidonem i celekoksibem (inhibitorem cyklooksygenazy-2, COX-2) u pacjentów z ostrymi zaostrzeniami schizofrenii, dało lepsze efekty niż monoterapia risperidonem [65], a dodatkowo blokowanie COX-2 miało korzystny wpływ na funkcje poznawcze [66]. Również interesujące są próby zastosowania w leczeniu schizofrenii minocykliny, hamującej aktywację mikrogleju istotnego w rozwoju zapalenia. Minocyklina poprawia funkcje poznawcze zarówno w modelach zwierzęcych jak i u pacjentów [67–69], a także wpływa korzystnie na objawy negatywne w badaniach klinicznych [68]. Skuteczna, szczególnie na objawy pozytywne, okazała się również terapia uzupełniająca aspiryną w dawce 1000 mg/dobę [70]. Co więcej, zachęcające wyniki dały także wstępne próby pilotażowe leczenia

schizofrenii za pomocą IFN- γ , w celu stymulacji monocytowej odpowiedzi immunologicznej typu 1 [71], otwierając nowe potencjalne możliwości leczenia. Niemniej jednak niezbędne są tutaj szersze badania i dogłębniejsze analizy.

Ciekawe jest także powiązanie schizofrenii z receptorem dla acetylocholin i zaburzeniami transmisji cholinergiczej w mózgu pacjentów ze schizofrenią [72]. Zaobserwowano bowiem, że nadmierne palenie papierosów łagodzi niektóre objawy pozytywne, negatywne, czy też poznawcze u chorych na schizofrenię [73]. Morfologiczne badania *post-mortem* wykazały zmiany w receptorach nikotynowych u pacjentów schizofrenicznych w porównaniu do grupy kontrolnej, szczególnie jeśli chodzi o podtyp $\alpha 7$ receptora nikotynowego dla acetylocholin, zlokalizowanego w obszarach mózgu zaangażowanych w funkcje poznawcze, takich jak kora czy hipokamp [74]. Badania molekularne potwierdzają ten fakt, wskazując na związek polimorfizmów w genach kodujących te receptory a schizofrenią [75,76].

Najnowsze doniesienia wskazują również na istotną rolę zaburzeń mikroflory jelitowej i dysbiozy w rozwoju wielu zaburzeń neurologicznych i psychologicznych, w tym schizofrenii, czy też depresji [77]. Inne badania pokazują także zmiany w układzie endokannabinoidowym u osób cierpiących na schizofrenię [78]. Konkretnie, wskazuje się na zwiększoną gęstość receptorów CB₁ w obszarze korykolimbicznym oraz podwyższony poziom anandamidu w płynie mózgowo-rdzeniowym [78]. Powraca się także do badań nad znaczeniem stresu oksydacyjnego w schizofrenii i jego preferencyjnym wpływem na interneurony [79,80]. Okazuje się bowiem, że stres oksydacyjny może leżeć u podstaw niedoborów związanych z mieliną w schizofrenii, co szczególnie odzwierciedla wrażliwość substancji białej bogatej w lipidy na działanie reaktywnych form tlenu [81].

Omawiając przyczyny schizofrenii, nie sposób nie wspomnieć o czynnikach genetycznych, psychologicznych, środowiskowych oraz społecznych [82,83]. Uwarunkowania genetyczne zwiększają ryzyko zapadalności na chorobę w rodzinach, w których pokrewieństwo choruje na schizofrenię, jednak nie są czynnikiem decydującym [83]. Należy zwrócić uwagę, że choroba rozwija się w czasie i może mieć swoje podłoże już w okresie płodowym, wynikając z powikłań położniczych, czy wspominanych już schorzeń w ciąży [31]. Obojętne nie pozostają także czynniki środowiskowe i społeczne, takie jak: trauma z dzieciństwa, dyskryminacja, problemy ekonomiczne czy izolacja społeczna, szczególnie u osób podatnych na zaburzenia [18]. Ta ogromna heterogeniczność choroby w znacznym stopniu utrudnia zarówno samą

diagnozę, jak i właściwe podejście terapeutyczne, dlatego tak ważne są nieustanne badania tym obszarze.

1.4 Leczenie schizofrenii

Ze względu na złożoną i nie do końca poznaną etiologię schizofrenii, głównym celem jej leczenia jest wyeliminowanie objawów i poprawienie funkcjonowania pacjentów oraz zapobieganie nawrotom choroby. Podstawą terapii schizofrenii są leki przeciwpsychotyczne (neuroleptyki), które pomagają kontrolować chorobę, redukując głównie objawy pozytywne [84,85]. Ich skuteczność jest znacznie mniejsza w przypadku objawów negatywnych i poznawczych [86]. U wielu pacjentów objawy negatywne utrzymują się pomiędzy okresami leczenia objawów pozytywnych, ale wczesny początek leczenia schizofrenii może zapobiegać rozwojowi objawów negatywnych w czasie [86]. Właściwy dobór leków jest niestety często utrudniony, ze względu na różnice w tolerancji, kwestie bezpieczeństwa farmakologicznego, a także możliwe czynniki ryzyka i choroby współistniejące.

Niezwykle trudno o jednoznaczną klasyfikację neuroleptyków w związku z ich zróżnicowanymi właściwościami, budową oraz profilem działania (Tab.1.3). Najczęściej wyróżnia się jednak dwie grupy leków przeciwpsychotycznych: tzw. neuroleptyki klasyczne (typowe, leki I generacji) i atypowe (leki II generacji), gdzie obie klasy leków działają przez układ dopaminergiczny, jako antagoniści receptora dopaminergicznego D_2 , a leki drugiej generacji określa się jako antagonistów dopaminy i serotoniny, ze względu na dodatkową blokadę receptorów serotoninowych [45,87]. Najnowsze klasyfikacje uwzględniają także leki III generacji, zindywidualizowane na podstawie mechanizmu działania, gdyż w przeciwieństwie do innych neuroleptyków nie blokują receptora dopaminergicznego D_2 , ale są jego częściowymi agonistami [86].

Tab. 1.3 Podział i profil działania receptorowego oraz klinicznego najważniejszych neuroleptyków [6,86,88]

Działanie	przeciwpsychotyczne	aktywizujące	uspokajające	przeciwdepresyjne	antyaautystyczne	pozapiramidowe	autonomiczne
Neuroleptyki klasyczne (typowe, leki I generacji)							
Chlorpromazyna	+++	-	++++	-	++	++	++
Lewomepromazyna	+	-	++++	++	-	++	++
Promazyna	+	-	+	-	+	+	+
Flufenazyna	+++	++	+	(+)	++	++	+
Haloperidol	++	-	+++	-	++	++++	+
Perazyna	++	+	++	-	++	+	+
Perfenazyna	++++	++	+	-	+++	+++	+
Tiorydazyna	+	-	++++	++	+	++	++
Chlorprotiksen	+	-	+++	+	+	+	++
Flupentiksol	+	+++	-	+	+++	++	++
Tiotiksen	+++	++++	+	-	++++	++	+
Pimozyd	+	+++	-	-	+++	+++	++
Zuklopentiksol	+++	-	+++++	(+)	++	+++	+
Sulpiryd	++	+++	-	+	++++	+	-
Loksapina	++	-	++	-	+	++	++
Neuroleptyki atypowe (leki II generacji)							
Klozapina	++	-	++++	-	+++	(+)	++
Olanzapina	++	-	+++	-	-	++	++
Kwetiapina	++	-	++	+	-	+	+
Risperidon	++++	+++	++	-	++++	++	++
Ziprasidon	+++	-	+	-	-	++	+
Paliperidon	++	+	+	-	-	++	+
Lurazydon	++	+	+	-	-	+	+
Asenapina	++	-	++	-	+	++	+
Sertindol	++	-	-	-	-	+	+
Amisulpryd	++	++	-	(+)	+	+	-
Neuroleptyki III generacji							
Aripiprazol	++	++	-	-	-	+	(+)
Breksiprazol	++	-	+	++	-	+	+
Kariprazyna	++	+	-	+	-	+	+

Działanie (+) nieznaczne, +słabe, ++ umiarkowane, +++ umiarkowanie silne, ++++ silne, +++++ bardzo silne

Pierwszym neuroleptykiem wprowadzonym do lecznictwa w 1952 roku była chlorpromazyna, która umożliwiła terapię ogromnej liczby pacjentów z ciężką chorobą psychiczną, jednak równocześnie wywołująca liczne efekty uboczne [89]. Blokada

receptorów dopaminergicznych D_2 w mózgu, bez selektywności względem konkretnej ścieżki dopaminy w ośrodkowym układzie nerwowym odpowiada za główne działania niepożądane klasycznych neuroleptyków, takich jak: objawy pozapiramidowe czy podwyższony poziom prolaktyny. Dodatkowo, nieselektywność neuroleptyków I generacji i ich równoczesne powinowactwo do receptorów histaminowych H_1 , muskarynowych M_1 i adrenergicznych α_1 skutkuje niekorzystnym działaniem przeciwhistaminowym, cholinolitycznym i adrenolitycznym [16]. Najważniejsze działania niepożądane leków przeciwpsychotycznych przedstawiono w Tabeli 1.4.

Wprowadzane następnie nowe leki II generacji charakteryzowały się lepszym profilem tolerancji i bezpieczeństwa w porównaniu do klasycznych neuroleptyków, a szczególnie istotne było zmniejszenie niepożądanych działań pozapiramidowych oraz mniejsze upośledzenie funkcji poznawczych, dzięki wyższej zdolności blokowania receptorów serotonergicznych $5-HT_{2A}$ niż dopaminergicznych D_2 , w porównaniu z klasycznymi neuroleptykami. Pewnego rodzaju rewolucją okazało się wprowadzenie we wczesnych latach 70-tych XX wieku nowego atypowego neuroleptyku, klozapiny, która zmniejszała częstotliwość opisywanych działań niepożądanych [90]. Obecnie klozapina, pomimo wysokiego ryzyka wywoływania agranulocytozy, jest zarejestrowana w terapii schizofrenii odpornej na leczenie innymi lekami, pod ścisłą kontrolą obrazu krwi pacjentów [90]. Niestety głównym ograniczeniem stosowania atypowych leków przeciwpsychotycznych są wywoływane zaburzenia metaboliczne i przybieranie na wadze, obserwowane najczęściej w przypadku klozapiny i olanzapiny [91–93] oraz zwiększone ryzyko arytmii powszechne dla ziprasidonu i risperidonu [94].

Pierwszym przełomowym atypowym neuroleptykiem, określanym jako lek III generacji, okazał się aripiprazol, będący częściowym agonistą receptora dopaminergicznego D_2 oraz receptorów serotonergicznych $5-HT_{1A}$ i $5-HT_{2A}$, który przy niskich stężeniach dopaminy zwiększa, a przy wysokich stężeniach zmniejsza wypalanie neuronów dopaminergicznych. Pozwala to na zachowanie pośredniego poziomu neuronalnego tonu dopaminergicznego pomiędzy pełnym agonistą i antagonistą, a tym samym ogranicza rozwój objawów pozytywnych związanych z nadmiarem dopaminy oraz niekorzystnych efektów pozapiramidowych przy zbyt niskich jej stężeniach [95]. Taki mechanizm działania aripiprazolu powoduje, że często określany jest on także jako „stabilizator dopaminy” [96–98].

Tab. 1.4 Działania niepożądane neuroleptyków [91,92]

Objawy ze strony OUN
Sedacja
Zaburzenia funkcji poznawczych
Napady padaczkowe
Objawy pozapiramidowe (akatyzyja, dystonia, późne dyskinezy, parkinsonizm polekowy)
Pobudzenie, niepokój
Złośliwy zespół poneuroleptyczny
Depresje
Ośrodkowy zespół antycholinergiczny i objawy odstawienne
Objawy ze strony układu sercowo-naczyniowego
Hipotonia ortostatyczna, zapaść
Tachykardia
Wydłużenie odcinka QTc
Zapalenie mięśnia sercowego, kardiomiopatia
Choroba niedokrwienna serca, udar
Objawy ze strony układu krwiotwórczego i krwi
Agranulocytoza, leukopenia
Leukocytoza
Eozynofilia
Zaburzenia krzepnięcia krwi
Objawy cholinolityczne obwodowe
Zaparcia
Suchość w jamie ustnej
Zatrzymanie moczu
Zaburzenia akomodacji oka
Objawy endokrynne
Hiperprolaktynemia, mlekotok, ginekomastia, zaburzenia miesiączkowania
Zaburzenia seksualne, spadek libido
Niedoczynność tarczycy
Objawy metaboliczne
Cukrzyca
Przyrost masy ciała, otyłość
Zespół metaboliczny
Podwyższenie poziomu trójglicerydów i cholesterolu
Objawy alergiczne
Reakcje skórne
Przebarwienia skóry
Nadwrażliwość na światło, fotouczulenia
Inne
Zapalenie płuc i ostra niewydolność oddechowa
Zator płucny i żylna choroba zakrzepowo-zatorowa
Zaburzenia czynności nerek i układu moczowego
Hepatotoksyczność
Osteoporoza
Zaburzenia żołądkowo-jelitowe (nudności, wymioty, biegunka, zaparcia)
Rak piersi i rak szyjki macicy
Zaburzenia regulacji temperatury ciała
Ślinotok

Obecnie, poza najczęściej stosowanym aripiprazolem, dostępne są dwa nowe atypowe neuroleptyki III generacji: kariprazyna i brekspiprazol [99–101]. Brekspiprazol charakteryzuje się niższą od aripiprazolu aktywnością wewnętrzną wobec receptora dopaminergicznego D_2 i około 10-krotnie wyższym powinowactwem do receptorów serotonergicznym $5-HT_{1A}$ i $5-HT_{2A}$, co potencjalnie zwiększa jego tolerancję [102]. Określany jest jako „modulator aktywności dopaminy i serotoniny” ze względu na częściowy agonizm do receptorów dopaminergicznym D_2 i serotonergicznym $5-HT_{1A}$, a także antagonizm do receptorów serotonergicznym $5-HT_{2A}$ oraz adrenergicznym $\alpha_{1B/2C}$ [102]. Kariprazyna natomiast posiada zbliżone do aripiprazolu powinowactwo do receptora dopaminergicznego D_2 i około 3-10-krotnie wyższą selektywność względem receptora dopaminergicznego D_3 niż D_2 , co może mieć korzystny wpływ na funkcje kognitywne [103,104]. Oprócz częściowego agonizmu do receptorów dopaminergicznym D_2 i D_3 , jest także częściowym agonistą receptorów serotonergicznym $5-HT_{1A}$ oraz antagonistą receptorów serotonergicznym $5-HT_{2A}$ i $5-HT_{2B}$ [105]. Oba leki są zatwierdzone w leczeniu schizofrenii, przy czym dodatkowo brekspiprazol może być stosowany w wspomagającym leczeniu depresji, a kariprazyna w leczeniu ostrych epizodów maniakalnych lub epizodach mieszanych w chorobie afektywnej dwubiegunowej [105,106].

Aktualnie w trzeciej fazie badań klinicznych jest nowy lek przeciwpsychotyczny o unikalnym profilu farmakologicznym, lumateperon (ITI-007). Łączy on w sobie właściwości silnego antagonisty receptora serotonergicznego $5-HT_{2A}$ (z 60-krotnie mniejszym powinowactwem do receptorów dopaminergicznym D_2) [107,108], modulatora receptorów dopaminergicznym (presynaptyczny częściowy agonista i postsynaptyczny antagonistą receptorów dopaminergicznym D_2 , o funkcjonalnej aktywności mezolimbicznej i mezkortykanej) i receptorów glutaminergicznym (zwiększający fosforylację podjednostek receptora NMDA) oraz dodatkowo inhibitora wychwyty zwrotnego serotoniny [109]. Opisany jest także jako „modulator fosfoproteiny dopaminy” [110,111]. Równocześnie wykazuje stosunkowo niskie powinowactwa względem receptorów histaminowych H_1 , muskarynowych czy serotonergicznym $5-HT_{2C}$, co wskazuje na ogólny korzystny profil tolerancji [109]. Aktualnie zakończono jego rejestrację w drugim badaniu fazy III u pacjentów ze schizofrenią, uzyskując dobrą tolerancję i profil bezpieczeństwa. Co więcej, badany jest także w III fazie w badaniach dotyczących depresji dwubiegunowej i zaburzeń

behawioralnych u pacjentów z demencją, a także podjęto próby opracowania jego preparatu o przedłużonym działaniu [110,111].

Warto także wspomnieć o dwóch nowych lekach będących w III fazie badań klinicznych w leczeniu późnych dyskinez: deutetrabenazynie (SD-809) i valbenazynie (NBI-98854). Późne dyskinezy, czyli mimowolne powtarzające się, bezcelowe ruchy języka, warg, żuchwy, twarzy, tułowia, kończyn górnych i dolnych oraz układu oddechowego stanowią ogromny problem wśród pacjentów leczonych przewlekle lekami przeciwpsychotycznymi [112–114]. Deutetrabenazyna i valbenazyna są inhibitorami pęcherzykowego transportera monoaminowego-2 (VMAT-2). Powodują wyczerpanie dopaminy synaptycznej i dają korzystne efekty w badaniach, stanowiąc potencjalną alternatywę dla pozarejestrowanej obecnie tetrabenazyny (leku sierocego, stosowanego w leczeniu ruchów płasawicznych choroby Huntingtona) [115].

Wśród nowych celów farmakologicznych w leczeniu schizofrenii pewne nadzieje wiąże się z wspomnianą już modulacją układu endokannabinowego przez kannabidiol i receptor kannabinoidowy CB₁. Kannabidiol to aktywny roślinny środek wyizolowany z konopii indyjskiej (*Cannabis sativa*), pozbawiony działania psychoaktywnego Δ^9 -tetrahydrokannabinolu, będący negatywnym modulatorem allosterycznym receptora kannabinoidowego CB₁, o potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej [116]. Ostatnie badania sugerują, że kannabidiol może być także częściowym agonistą receptora dopaminergicznego D₂ [117], co wskazywałoby na unikalny mechanizm działania przeciwpsychotycznego. Pierwsze próby zastosowania kannabidiolu u pacjentów z objawami psychotycznymi potwierdziły skuteczność, bezpieczeństwo i dobrą tolerancję związku jednak z pewnością konieczne są duże randomizowane badania kliniczne, aby móc go wprowadzić jako nową terapię do praktyki klinicznej [116].

Inne nowe podejście terapeutyczne, związane jest z opisywaną teorią glutaminergiczną schizofrenii. Badania wskazują, że związki modulujące receptory NMDA działają korzystnie na objawy negatywne oraz zaburzenia nastroju i funkcji poznawczych, głównie poprzez wzmacnianie miejsca glicyny w receptorze NMDA [118,119]. Dużą uwagę skupiają także metabotropowe receptory glutaminianu (mGluR), jako potencjalne cele leków, ze względu na możliwości subtelniejszego fazowego uwalniania glutaminianu w porównaniu z receptorami jonotropowymi. Badania przedkliniczne i kliniczne sugerują, że aktywacja receptora mGluR z grupy II może łagodzić objawy schizofrenii. Podjęto próby oddziaływania na układ

glutaminergiczny za pośrednictwem pomaglometadu metionilu, który jest silnym i wysoce selektywnym, ortosterycznym agonistą receptora mGluR2/3 [120]. W badaniach przedklinicznych związek ten normalizuje podwyższoną aktywność glutaminianu w korowych neuronach piramidowych [120]. Co więcej, analizy danych klinicznych sugerują, że pomaglometad metionilu jest najbardziej skuteczny we wczesnej fazie rozwoju schizofrenii (poniżej 3 lat), ze stwierdzoną nadreaktywnością transmisji glutaminergicznej [120], przy czym w badaniach II fazy nie potwierdzono jego korzystnego wpływu na pozytywne i negatywne objawy schizofrenii. Także podtyp 5 receptora mGluR, kodowany przez gen GRM5 i jego aktywacja, wskazują na skuteczność w przedklinicznych modelach schizofrenii, szczególnie w leczeniu zaburzeń poznawczych [118,121]. Istnieje więc nadzieja, że zostaną opracowane nowe potencjalne leki przeciwpsychotyczne, działające poprzez receptory mGluR, spowalniające postęp choroby i poprawiające rokowania pacjentów.

Innym celem farmakologicznym istotnym w patogenezie schizofrenii wydają się być receptory dopaminergiczne D₃. Obecnie, nie ma wielu danych dotyczących ich udziału w objawach choroby, jednak dostępne informacje wskazują u różnych gatunków zwierząt na ich wysokie podobieństwo strukturalne do receptorów dopaminergicznych D₂ i D₄ oraz na wysoką homologię [122] i identyczność w regionach transbłonowych, w tym także w miejscu wiązania [123]. Bliskie podobieństwo strukturalne powoduje jednak, że trudno zaprojektować substancje, które działałyby selektywnie względem receptora dopaminergicznego D₃. Równocześnie, okazuje się, że wiele spośród zatwierdzonych leków oddziałujących na receptor dopaminergiczny D₂, wchodzi również w interakcje z receptorem dopaminergicznym D₃ [124]. Pierwszym przykładem częściowego agonisty receptora dopaminergicznego D₃, wykazującym efekty przeciwpsychotyczne w przedklinicznych modelach zwierzęcych, jest wspomniana wcześniej karpiprazyna [125].

Nie bez znaczenia pozostaje również powiązanie schizofrenii z receptorem dla acetylocholin. Dostępne dane sugerują korzystny wpływ na objawy negatywne choroby na skutek aktywacji podtypu $\alpha 7$ receptora nikotynowego dla acetylocholin. Badana pod tym kątem enceniklina, prezentuje dodatkowo zachęcające wyniki w poprawie dysfunkcji poznawczych u pacjentów. Obecnie, obok encenikliny w fazie rozwoju w badaniach klinicznych pozostają jeszcze inni agoniści podtypu $\alpha 7$ receptora nikotynowego dla acetylocholin (np. AQW051, GTS-21), dając nadzieje na nowe możliwości terapii [75,76].

Warto wspomnieć, że poza poszukiwaniem nowych celów terapeutycznych w leczeniu schizofrenii naukowcy skupiają się także na poprawie skuteczności działania dostępnych neuroleptyków tworząc nowe formułacje leków. Szczególnie korzystne, w przypadku przewlekłej choroby jaką jest schizofrenia, są leki o długotrwałym działaniu, które zapewniają ciągłą terapię i stałe stężenie leku w osoczu przez kilka tygodni, ułatwiając pacjentowi przestrzeganie zaleceń terapeutycznych i zwiększając tym samym szanse na poprawę zdrowia [126]. Ostatnio FDA (ang. *Food and Drug Administration*) wprowadziło do leczenia dwie nowe formułacje leków przeciwpsychotycznych II generacji jako iniekcje domięśniowe, to jest: lauroksyl aripiprazolu i palmitynian paliperidonu. Lauroksyl aripiprazolu, jest prolekiem metabolizowanym do N-hydroksymetylopiperazolu, a następnie do aripiprazolu oraz aktywnego farmakologicznie dehydroaripiprazolu, zatwierdzonym do leczenia schizofrenii u dorosłych [127]. Drugi z leków, palmitynian paliperidonu jest korzystny ze względu na możliwość dawkowania raz na trzy miesiące i może być stosowany jako leczenie podtrzymujące schizofrenii [128]. Dodatkowo, opracowywana jest także nowa formułacja lauroksylu aripiprazolu, do wstrzyknięć domięśniowych co dwa miesiące [129] oraz preparat risperidonu do wstrzyknięć podskórnych [130].

Nie można zapomnieć, że obok skutecznej farmakoterapii niezmiernie ważne w schizofrenii jest także leczenie psychologiczne, a szczególnie tzw. psychoterapia poznawczo – behawioralna (ang. *Cognitive Behavioral Therapy*, CBT), która pomaga zrozumieć stan pacjenta i ułatwia radzenie sobie w codziennym życiu [83]. Psychoterapia może w znacznym stopniu zmienić sposób myślenia i zachowania pacjenta, przyczyniając się do poprawy jego samopoczucia. Ważne jednak, aby metody niefarmakologiczne stosowane były jako metody dodatkowe do leków, a nigdy jako terapia substytucyjna [6].

1.5 Schizofrenia i zaburzenia depresyjne

Istnieją bardzo bliskie relacje pomiędzy objawami negatywnymi w schizofrenii, a depresją [131], co często stwarza problemy w odróżnieniu obu jednostek chorobowych. Najczęściej jako wspólne objawy dla obu schorzeń wyróżnia się: wycofanie społeczne, utratę motywacji i anhedonię, czyli obniżoną zdolność do odczuwania przyjemności [132]. W przypadku anhedonii udało się rozróżnić jej dwa

rodzaje: anhedonię motywacyjną, związaną z motywacją dążenia do nagrody oraz anhedonię konsumpcyjną, związaną z przyjemnością doświadczaną w oczekiwaniu na nagrodę. Przyjmuje się, że anhedonia konsumpcyjna może być bardziej powiązana z depresją, a motywacyjna przypomina pierwotny objaw negatywny, co w pewien sposób pozwala na rozróżnienie obu chorób [132].

Według Birchwood'a, istnieją trzy odrębne ścieżki rozwoju depresji w schizofrenii: depresja, która jest nieodłącznie związana z psychozą, depresja, która jest psychologiczną reakcją na diagnozę oraz depresja, jako dowód historycznej traumy z dzieciństwa [133]. Różnego rodzaju traumy, zaniedbania czy społeczne niepowodzenia są jednymi z głównych czynników ryzyka rozwoju zarówno schizofrenii [134], jak i innych zaburzeń, w tym także depresji. Obecnie depresja uznawana jest za powszechny, oddzielny zespół w przebiegu schizofrenii i występuje u ponad 50% pacjentów schizofrenicznych [135,136]. Współwystępowanie depresji u pacjentów ze schizofrenią wiąże się ze zwiększeniem częstotliwości epizodów psychotycznych [137], wydłużonym czasem trwania choroby [138], nawrotami psychoz i hospitalizacji psychiatrycznych [139], obniżoną jakością życia, a nawet samobójstwami [140,141]. Pomimo wyraźnej potrzeby, aktualnie nie ma konkretnych wskazówek i wytycznych dotyczących leczenia depresji w schizofrenii, dlatego też klinicyści bazują głównie na osobistym doświadczeniu [142]. Powszechne w schizofrenii objawy negatywne są najczęściej trudne do leczenia za pomocą dostępnych leków przeciwpsychotycznych, stąd stosuje się leki dodatkowe, w tym także antydepresanty. Próby łączenia neuroleptyków z lekami przeciwdepresyjnymi sugerują możliwą poprawę leczenia, jednak dane na ten temat są wciąż mocno ograniczone, a nawet sprzeczne [143–145]. Najlepsze efekty zaobserwowano w przypadku stosowania leków przeciwdepresyjnych działających na receptory monoaminowe, co równocześnie wpływało na poprawę funkcji poznawczych u pacjentów [144]. Należy pamiętać, że jednoczesne przyjmowanie leków przeciwdepresyjnych i przeciwpsychotycznych może potencjalnie prowadzić do zaburzeń rytmu serca, w tym szczególnie wydłużenia odstępu QT, dlatego niezbędne jest monitorowanie pracy serca [132]. Ostatnie badania Helfer'a i współpracaczy, wskazują na bezpieczeństwo i skuteczność leków przeciwdepresyjnych dodanych do leków przeciwpsychotycznych w leczeniu schizofrenii [146], jednak potwierdzenie tej tezy wymaga szerszych analiz. Skala opisywanego problemu jest niezmiernie wysoka, dlatego tak ważne są badania i poszukiwanie nowych leków, skutecznych w leczeniu zaburzeń depresyjnych w schizofrenii.

1.6 Schizofrenia i zaburzenia lękowe

Niepokój odczuwany przez pacjentów ze schizofrenią jest jak dotąd jedną z najmniej zbadanych cech tej choroby [147]. Dostępne dane wskazują, że zaburzenia lękowe w rzeczywistości są bardzo powszechne u pacjentów ze schizofrenią, szacując na częstość ich występowania u około 30-60% chorych [148,149]. Okazuje się, że najczęściej badanymi i równocześnie najbardziej rozpowszechnionymi schorzeniami współwystępującymi w schizofrenii są: zaburzenia obsesyjno-kompulsywne i lęk paniczny [150,151], a także lęk społeczny [152] i zespół stresu pourazowego [153,154]. Zaburzenia te pojawiają się u pacjentów z psychozą w taki sam sposób, jak u pacjentów cierpiących wyłącznie na zaburzenia lękowe [155]. Z jednej strony doniesienia sugerują, że zwiększony niepokój może wynikać z pojawienia się objawów pozytywnych i negatywnych u chorych, co może wpływać na możliwości radzenia sobie z napotkanymi stresorami [156,157], jednak z drugiej strony badania nie potwierdzają tego związku i wykazują niezależność lęku od psychopatologii choroby [158]. Przyjmuje się, że lęk determinowany jest głównie przez wczesne czynniki środowiskowe, a także pewne wymiary społeczno-poznawcze, jak np. osobiste cierpienie [159]. Przeprowadzone badania wykazały bowiem znaczący wpływ niekorzystnych doświadczeń z dzieciństwa z następowym stresem osobistym na wystąpienie zaburzeń lękowych u pacjentów ze schizofrenią, bez wyraźnego wkładu w nasilenie objawów, ani ogólną wydajność poznawczą [159]. Inne badania pokazują, że osoby ze współwystępującymi zaburzeniami lękowymi charakteryzują się niejako swoistym profilem objawów, gdyż częściej wykazują objawy pozytywne i charakterystyczny dla lęku zespół nadmiernej ruchliwości [160]. Często z tym zespołem pojawiają się pewne dysfunkcje ze strony autonomicznego układu nerwowego i objawy związane ze stresem, takie jak: przewlekły ból, zespół jelita drażliwego, czy dysautonomia [161]. Badania wskazują również, że zaburzenia kognitywne i poczucie wstydu towarzyszące zdiagnozowanej chorobie psychicznej przyczyniają się do występowania lęku społecznego u osób z psychozą [162]. Lęk społeczny może składać się z: negatywnej samooceny, poczucia dyskomfortu i tendencji do wycofywania się z towarzystwa innych osób. Wszystkie te objawy przyczyniają się do zwiększonego ryzyka samobójstw, a także nawrotów choroby, równocześnie zmniejszając zdolność do funkcjonowania w otoczeniu społecznym [163,164]. Biorąc pod uwagę fakt, że około

10% chorych na schizofrenię umiera z powodu samobójstwa, nie należy lekceważyć dodatkowego niekorzystnego wpływu lęku na zwiększone myśli samobójcze. Przeprowadzone analizy pozwalają także stwierdzić, że wśród pacjentów ze schizofrenią i współistniejącymi zaburzeniami lękowymi pojawiają się poważniejsze ograniczenia w dziedzinach pracy i życia społecznego oraz silniejsze upośledzenie czynnościowe niż u pacjentów bez zaburzeń lękowych [165,166]. Istotny jest fakt, że próby leczenia ukierunkowanego na zaburzenia lękowe, obejmujące nie tylko kognitywną terapię behawioralną, ale także leki: benzodiazepiny czy selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, wykazały pozytywny wpływ na jakość życia, a także zmniejszone nasilenie objawów u osób chorych na schizofrenię [167–169]. Warto więc uwzględnić korzyści i poprawę funkcjonowania społecznego płynące z leczenia lęku u tych pacjentów. Ciekawe są również wyniki badań wskazujące, że genetyczne czynniki ryzyka schizofrenii są bezpośrednio związane ze zwiększonymi stanami lękowymi na długo przed wystąpieniem objawów psychotycznych, a same objawy lękowe i afektywne często występują w fazie prodromalnej choroby i poprzedzają nawroty psychotyczne [170]. Fakt ten i ewentualne celowanie w objawy lękowe, mogłyby otworzyć nowe możliwości do prewencji pierwotnej i wtórnej schizofrenii, ale wymaga to szerszych badań.

1.7 Schizofrenia i zaburzenia kognitywne

Prowadzone badania wskazują, że upośledzenie funkcji poznawczych pojawia się nawet u 75-85% pacjentów ze schizofrenią [171] i może się utrzymywać nawet po skutecznym wyleczeniu innych objawów [172]. Najczęściej dysfunkcje poznawcze występują jeszcze przed ujawnieniem się choroby [173,174] lub są jej pierwszym i głównym objawem [175], równocześnie towarzysząc jej niemal na każdym etapie klinicznym [176]. Co więcej, nasilenie deficytów poznawczych może być czynnikiem predykcyjnym, między innymi w aspekcie ogólnych zasad przestrzegania leczenia [177], czy też zwiększonej tendencji do nawrotów u pacjentów z pierwszym epizodem schizofrenii [178]. Zakres upośledzeń poznawczych w przebiegu schizofrenii jest niezwykle szeroki i dotyczy między innymi: pamięci epizodycznej, pamięci roboczej, szybkości przetwarzania informacji, czy też funkcji wykonawczych [179]. Pacjenci mają problem w postrzeganiu rzeczywistości, osłabioną czujność i uwagę, trudności

w rozwiązywaniu problemów oraz z umiejętnościami motorycznymi i językowymi [176]. Uszkodzenia w tych domenach są równoznaczne ze zmianami w systemach nerwowych odpowiedzialnych za wspomniane funkcje poznawcze, a także z upośledzeniem funkcji przyśrodkowych płatów skroniowych [180,181], kory przedczołowej [182] oraz szeregu systemów neuroprzekaźników odpowiadających za prawidłowe funkcjonowanie poznawcze. Wszelkie deficyty kognitywne towarzyszące schizofrenii wpływają niekorzystnie na funkcjonowanie pacjentów i ich jakość życia [183,184]. Pomimo ogromnego postępu w dziedzinie genetyki, obrazowania i neurochemicznych analiz pośmiertnych oraz szerokiej gamy potencjalnych celów farmakologicznych, wciąż brakuje właściwych środków poprawiających funkcje kognitywne w schizofrenii. Do niedawna skupiano się wyłącznie na opracowywaniu leków zmniejszających objawy pozytywne w schizofrenii [45]. Obecnie poszukuje się nowych leków, między innymi wśród: modulatorów dopaminy, receptora GABA, receptorów cholinergicznych, glutaminergicznych czy receptorów sigma, a także wśród neurosteroidów oraz środków neuroprotektoryjnych poprawiających neuroplastyczność i neurogenezę, jednak heterogeniczność mechanizmów odpowiedzialnych za deficyty poznawcze w schizofrenii odpowiada za ciągle niepowodzenia w tej kwestii [185–190]. Próby leczenia zaburzeń poznawczych poprzez stosowanie atypowych leków przeciwpsychotycznych (jak np. klozapina, olanzapina, aripiprazol, risperidon, ziprasidon, amisulprid, kwetiapina), mogą przynosić pewną poprawę, dzięki większej skuteczności tych leków na objawy pozytywne i negatywne, a także ze względu na mniej działań niepożądanych i efektów antycholinergicznych oraz bezpośredni wpływ na funkcjonowanie mózgu, poprzez przywrócenie aktywności przedczołowej dopaminy [176,191]. Leki te jednak, nie normalizują deficytów neurokognitywnych w schizofrenii [192], dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych możliwości ich leczenia, przy zminimalizowanym ryzyku efektów ubocznych i zwiększonej skuteczności w domenach objawów negatywnych i poznawczych.

1.8 Schizofrenia i zaburzenia układu sercowo – naczyniowego

Stosowanie leków przeciwpsychotycznych związane jest niestety także z niekorzystnym wpływem na układ sercowo-naczyniowy [193,194]. Pojawiające się działania niepożądane mogą się znacznie różnić, nawet przy stosowaniu dawek

terapeutycznych leków. Okazuje się, że nagła śmierć sercowa na skutek leczenia neuroleptykami może występować nawet u pacjentów bez ryzyka sercowo-naczyniowego [195]. Wśród innych, rzadziej występujących działań niepożądanych, wlicza się także zawał mięśnia sercowego, czy też zapalenie mięśnia sercowego [195]. Pomimo tego, leki przeciwpsychotyczne nadal pozostają podstawą leczenia pacjentów psychiatrycznych. Konieczna jest jednak zwiększona świadomość bezpieczeństwa sercowo-naczyniowego tych środków i ściśle monitorowanie stanu pacjentów.

Wśród wielu pacjentów leczonych na schizofrenię obserwuje się skłonność do zaburzeń rytmu serca, takich jak na przykład zespół Brugadów [196]. Co więcej, przyjmowanie leków przeciwpsychotycznych może także zmieniać aktywność elektryczną serca, przyczyniając się najczęściej do wydłużenia odstępu QTc (kalkulowany odstęp QT), nawet u pacjentów młodszych, a w szczególności kobiet [197,198]. Powoduje to zwiększone ryzyko wystąpienia arytmii typu *torsades de pointes* oraz nagłej śmierci sercowej. Istotny jest również fakt, że ryzyko wydłużenia odstępu QTc zależy od dawki leku, a dodanie drugiego leku przeciwpsychotycznego zwiększa to ryzyko w porównaniu z monoterapią [199]. Przeprowadzone badania i metaanalizy wskazują, że najwyższy potencjał wydłużający odstęp QTc mają przede wszystkim: amisulpryd, paliperidon, risperidon, sertindol, ziprasidon i tiorydazyna [200]. Natomiast w celu uniknięcia wydłużenia odstępu QTc oraz zmniejszenia ryzyka częstoskurczu komorowego lekarze mogą zalecić pacjentom stosowanie aripiprazolu, brekspiprazolu lub olanzapiny, w zarejestrowanych dawkach. [201]. Co więcej, zaleca się ocenę ryzyka arytmii u pacjentów, jeszcze przed zaoferowaniem leczenia atypowymi lekami przeciwpsychotycznymi, a także rutynowe monitorowanie EKG (elektrokardiogramu) u wszystkich pacjentów stosujących te leki, pod kątem wydłużenia odstępu QTc [202,203].

Drugim, bardzo częstym działaniem niepożądanym związanym z przyjmowaniem neuroleptyków jest spadek ciśnienia tętniczego i omdlenia. Wynikające z tego upadki mogą prowadzić do niebezpiecznych powikłań, takich jak: złamania biodra, przemijające ataki niedokrwienne, rzadziej zawał mięśnia sercowego, a nawet śmierć [204]. Problem hipotensji ortostatycznej wiąże się z blokadą receptorów adrenergicznych α_1 , stąd szczególnie niebezpieczne mogą być leki charakteryzujące się wysokim powinowactwem wobec tych receptorów, takie jak: iloperidon, ziprasidon, risperidon, kwetiapina, asenapina, haloperidol, chloropromazyna czy perfenazyna [205]. U pacjentów przyjmujących klozapinę, szczególnie na początku leczenia, także

zaobserwowano zwiększone ryzyko niedociśnienia, stąd zaleca się początkowe przyjmowanie możliwie niskich dawek tego leku [206].

Badania zwracają również uwagę na rozwijającą się w trakcie leczenia neuroleptykami tachykardię. Częstoskurcz serca pojawia się niemal u jednej trzeciej pacjentów leczonych klozapiną [207]. Co więcej, wieloogniskowy częstoskurcz przedsionkowy może rozwinąć się także u osób stosujących risperidon [208]. Ważne jest zatem, by wykrytą tachykardię w trakcie terapii psychiatrycznej kontrolować za pomocą badania EKG, a jeśli konieczne niezwłocznie leczyć.

Biorąc pod uwagę towarzyszące leczeniu przeciwpsychotycznemu liczne działania niepożądane, szczególnie ze strony układu krążenia, bardzo ważne jest poszukiwanie nowych leków w terapii schizofrenii, które przy wysokiej skuteczności i dobrej tolerancji, byłyby pozbawione niekorzystnego wpływu na układ sercowo-naczyniowy.

1.9 Podsumowanie

Leczenie schizofrenii wciąż należy do jednego z najtrudniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Ogromny postęp naukowy oraz badania prowadzone w obszarze psychiatrii pozwalają poznawać złożone i skomplikowane patomechanizmy, leżące u źródła choroby i tym samym otwierają nowe kierunki poszukiwań leków. Pomimo tak wielu nowych teorii schizofrenii, dostępne obecnie na rynku leki przeciwpsychotyczne, blokujące receptory dopaminergiczne D_2 i serotoninerdyczne $5-HT_{2A}$ wciąż pozostają najskuteczniejsze w leczeniu klinicznym pacjentów, niezależnie od swoich ograniczeń. Badania wskazują na różne efekty leczenia pomiędzy klasycznymi i atypowymi neuroleptykami [209]. Okazuje się bowiem, że terapia olanzapiną może chronić przed progresywną utratą substancji szarej, czego nie zaobserwowano w przypadku terapii haloperidolem [209]. Pozwala to stwierdzić, że atypowe neuroleptyki, które poza blokadą receptorów dopaminergicznych D_2 , antagonizują również receptory serotoninerdyczne $5-HT_{2A}$, mogą leczyć nie tylko objawy schizofrenii, ale także podstawowy proces chorobowy. Na tej podstawie sugeruje się, że przewaga atypowych neuroleptyków tkwi w możliwości blokowania nadmiernej transmisji serotoninerdycznej, jako głównego źródła choroby [26].

Co więcej, dostępne badania przedkliniczne wskazują na istotną rolę agonistów receptora serotonergicznego 5-HT_{1A} w leczeniu schizofrenii, a także ich efekty przeciwdepresyjne, anksjolityczne, redukujące objawy negatywne i pozapiramidowe oraz pozytywny wpływ na procesy poznawcze [210,211]. Podkreśla się, że postsynaptyczny agonizm do receptorów serotonergicznym 5-HT_{1A} może mieć korzystne efekty terapeutyczne w świetle teorii glutaminergicznej schizofrenii [212]. Dodatkowo, coraz szerzej bada się także receptory serotonergiczne 5-HT₆ i 5-HT₇, jako potencjalne cele terapeutyczne dla leków przeciwpsychotycznych, przeciwdepresyjnych oraz przeciwlękowych. W zwierzęcych modelach zaburzeń psychicznych udowodniono istotną aktywność, zarówno wśród agonistów jak i antagonistów receptorów 5-HT₆, a w przypadku ich blokady także korzystne efekty na zaburzenia poznawcze oraz procesy pamięci i uczenia się [213,214]. Z kolei antagoniści receptora 5-HT₇ wykazują w badaniach skuteczność zarówno w leczeniu stanów depresyjnych jak i lękowych, a także udział w regulacji snu [215,216], co stanowi pożądane cechy dla potencjalnego leku przeciwpsychotycznego, o wielokierunkowym mechanizmie działania.

W pełni uzasadnione jest zatem poszukiwanie nowych leków, właśnie wśród antagonistów, czy też częściowych agonistów receptora dopaminergicznego D₂ i serotonergicznego 5-HT_{2A}, z dodatkowym powinowactwem do innych receptorów serotonergicznym, tj. 5-HT_{1A}, 5-HT₆ i 5-HT₇. Badanie takich wielofunkcyjnych ligandów stało się inspiracją dla powstania niniejszej pracy doktorskiej, z nadzieją na postęp w poszukiwaniu nowych potencjalnych leków, skuteczniej zwalczających objawy negatywne schizofrenii, poprawiających funkcje poznawcze oraz łagodzących schorzenia współwystępujące takie jak: depresja i lęk, przy równocześnie zminimalizowanym niekorzystnym wpływie na układ sercowo-naczyniowy. Koncepcja ta jest zgodna z aktualnym kierunkiem poszukiwań nowych leków oddziałujących równocześnie na wiele celów biologicznych (MTA – *multi-target agent*) [217,218].

2 Cel

Celem niniejszej pracy było oznaczenie potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej ośmiu nowych pochodnych salicylamidu, zbadanie ich aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej w testach behawioralnych u myszy oraz określenie wpływu na układ sercowo-naczyniowy. Dla wybranych związków oznaczono również potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną u szczurów, zbadano aktywność przeciwłękową w teście zagrzebywania u myszy oraz zweryfikowano ich wpływ na funkcje kognitywne u myszy w teście biernego unikania i w teście rozpoznawania nowego obiektu.

We wstępnych badaniach farmakologicznych określono:

w badaniach *in vitro*:

- powinowactwo do receptorów dopaminergicznych D_2
- powinowactwo do receptorów serotoninerdycznych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇
- powinowactwo do receptorów adrenergicznych α_1 i α_2
- aktywność wewnętrzną wobec receptorów dopaminergicznych D_2
- aktywność wewnętrzną wobec receptorów serotoninerdycznych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₇

w badaniach *in vivo*:

- potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 (dizocylpiny) oraz amfetaminy u myszy
- potencjalną aktywność przeciwdepresyjną w teście wymuszonego pływania oraz w teście zawieszania za ogon u myszy
- potencjalną aktywność przeciwłękową w teście czterech płytek i w teście uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy
- wpływ na ruchliwość spontaniczną u myszy
- wpływ na indukowanie katalepsji w teście metalowego pręta u myszy
- wpływ na koordynację ruchową w teście rotarod u myszy

w badaniach weryfikujących wpływ na układ sercowo-naczyniowy:

- wpływ na ciśnienie skurczowe i rozkurczowe krwi u normotensyjnych szczurów „metodą ostrą”
- wpływ na presyjne działanie metoksaminy u szczurów
- wpływ na prawidłowy elektrokardiogram u szczurów

W rozszerzonych badaniach farmakologicznych dla wyselekcjonowanych związków oznaczono:

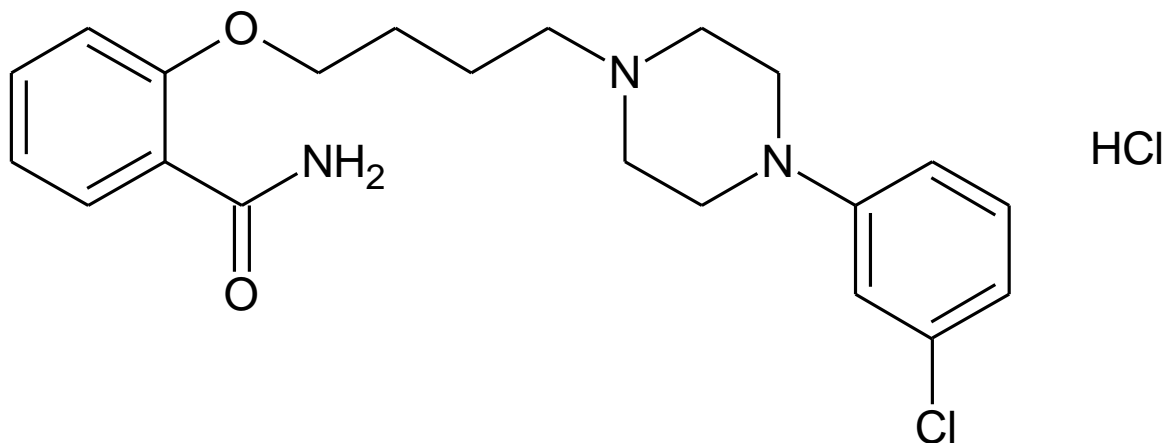
- potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną w teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów
- potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną w teście bramkowania przed sygnałowego po podaniu MK-801 u szczurów
- potencjalną aktywność przeciwłękową w teście zagrzebywania u myszy
- wpływ na funkcje kognitywne w teście biernego unikania oraz w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy
- wpływ na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście biernego unikania i w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy

3 Materiały

3.1 Badane związki

Badaniami farmakologicznymi objęto osiem nowych arylopiperazynoalkilowych pochodnych salicylamidu, zsyntetyzowanych w Instytucie Chemii i Technologii Organicznej Politechniki Krakowskiej przez dr inż. Jolantę Jaśkowską, we współpracy z Zakładem Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Kołaczekowskiego. Symbole, nazwy chemiczne oraz wzory badanych związków przedstawiono poniżej (Ryc. 3.1-3.8).

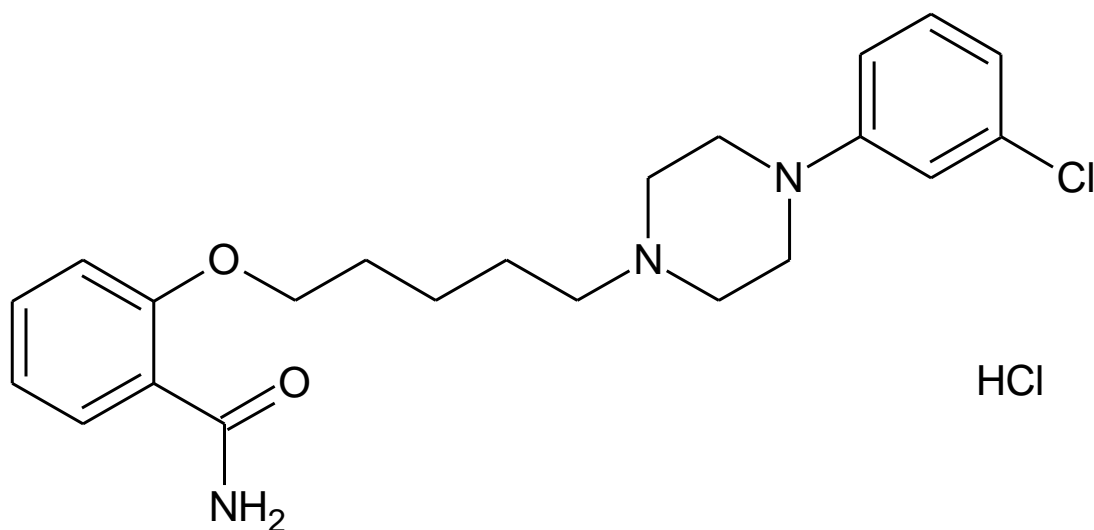
Wzory badanych związków



Ryc. 3.1 Wzór strukturalny związku JJGW01

JJGW01

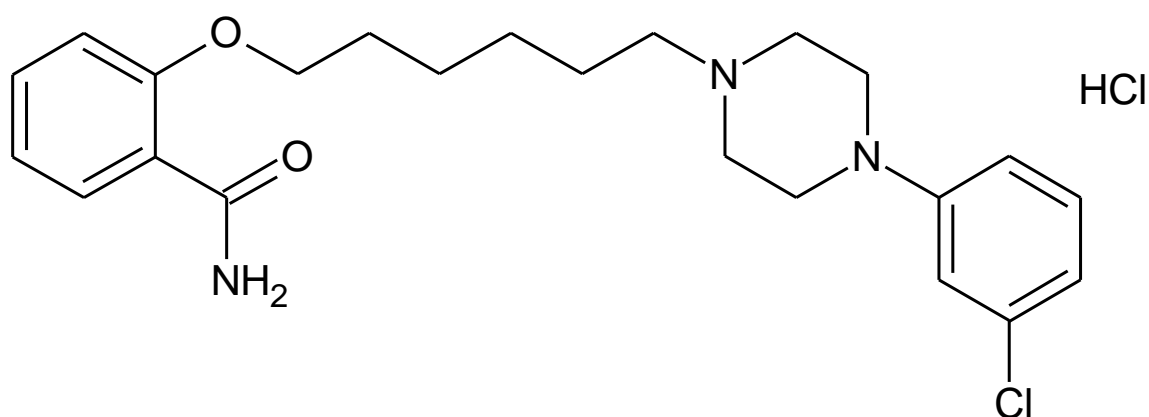
chlorowodorek 2-{4-[4-(3-chlorofenylo)piperazyn-1-ylo]butoksy}benzamidu



Ryc. 3.2 Wzór strukturalny związku JJGW02

JJGW02

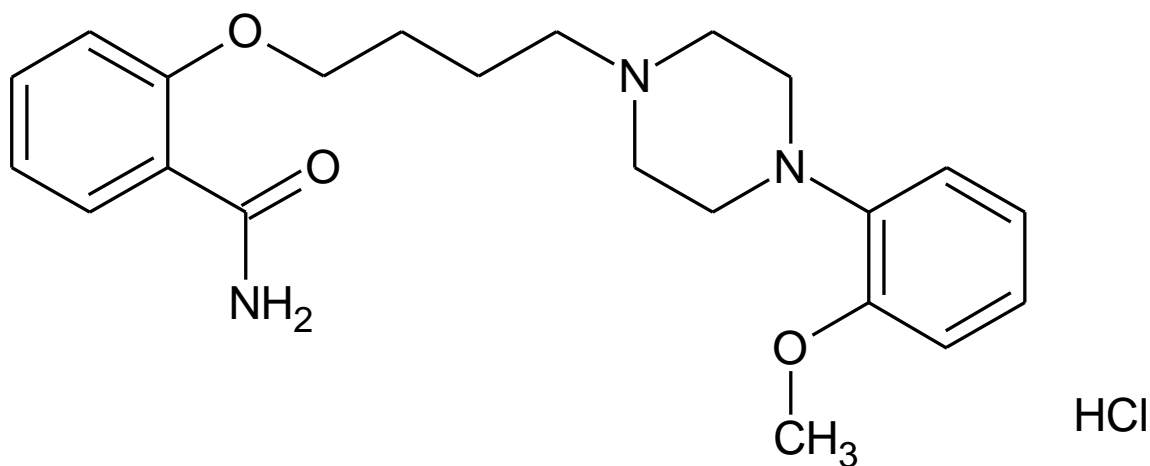
chlorowodorek 2-({5-[4-(3-chlorofenylo)piperazyn-1-ylo]pentylo}oxy)benzamidu



Ryc. 3.3 Wzór strukturalny związku JJGW03

JJGW03

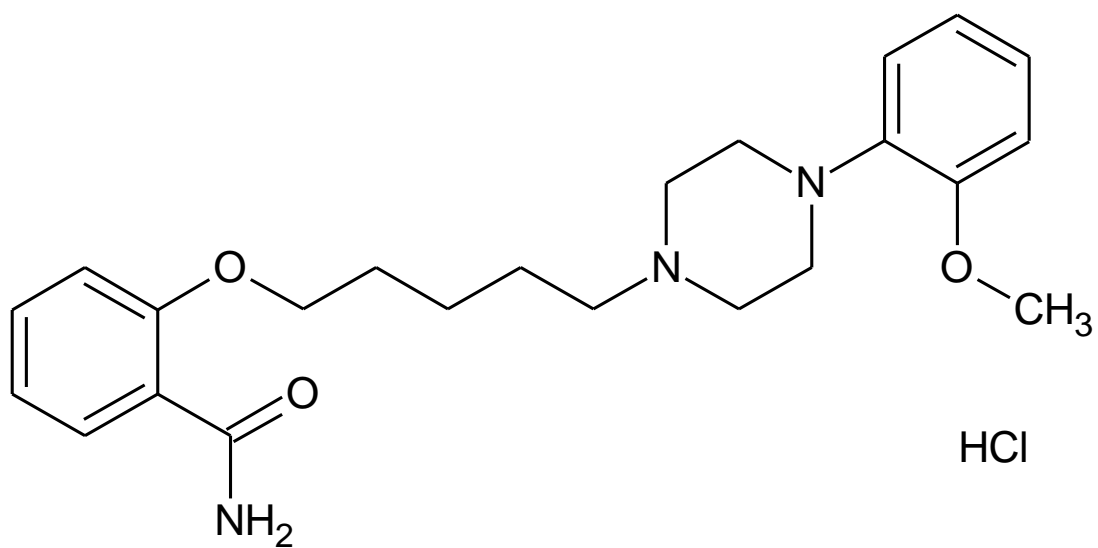
chlorowodorek 2-({6-[4-(3-chlorofenylo)piperazyn-1-ylo]heksylo}oksy)benzamidu



Ryc. 3.4 Wzór strukturalny związku JJGW07

JJGW07

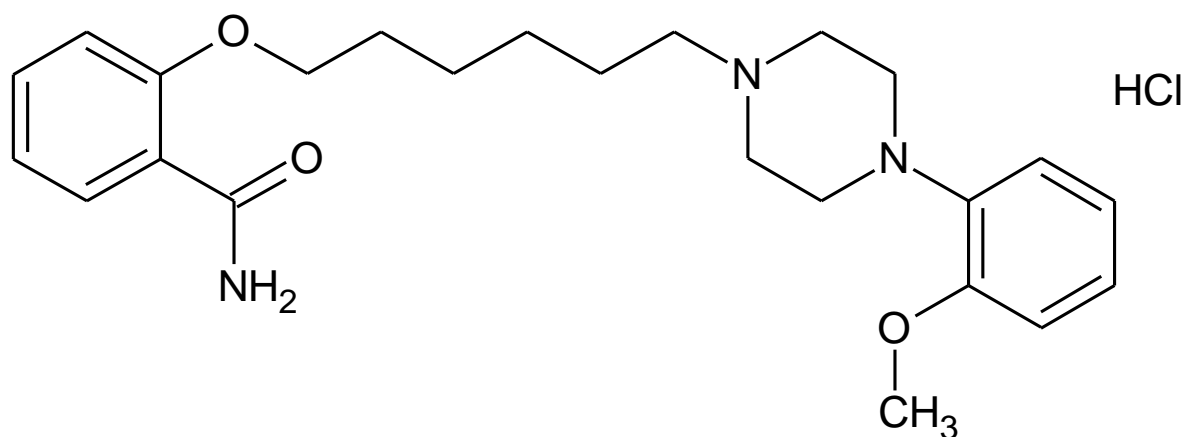
chlorowodorek 2-{4-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]butoksy}benzamidu



Ryc. 3.5 Wzór strukturalny związku JJGW08

JJGW08

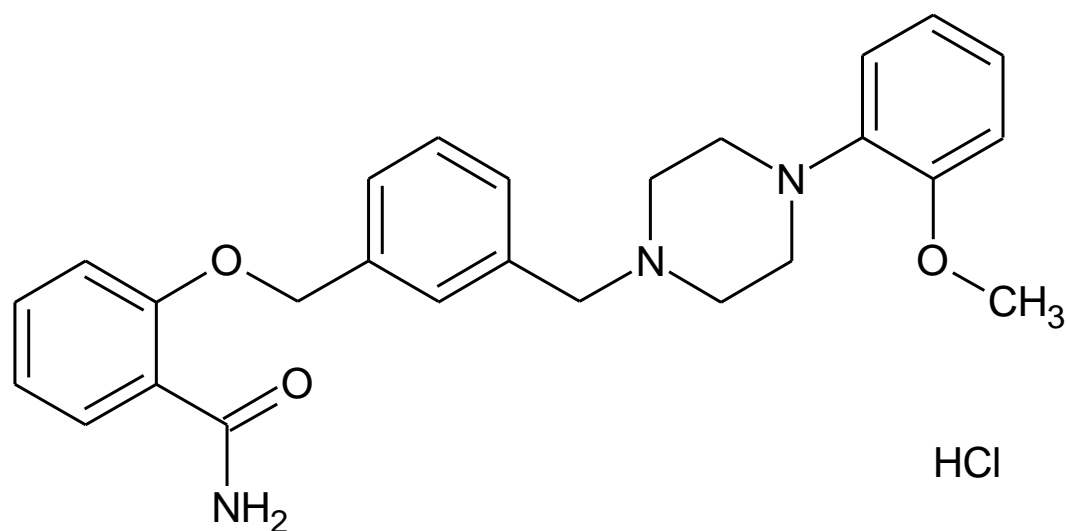
chlorowodorek 2-({5-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]pentyl}oksy)benzamidu



Ryc. 3.6 Wzór strukturalny związku JJGW09

JJGW09

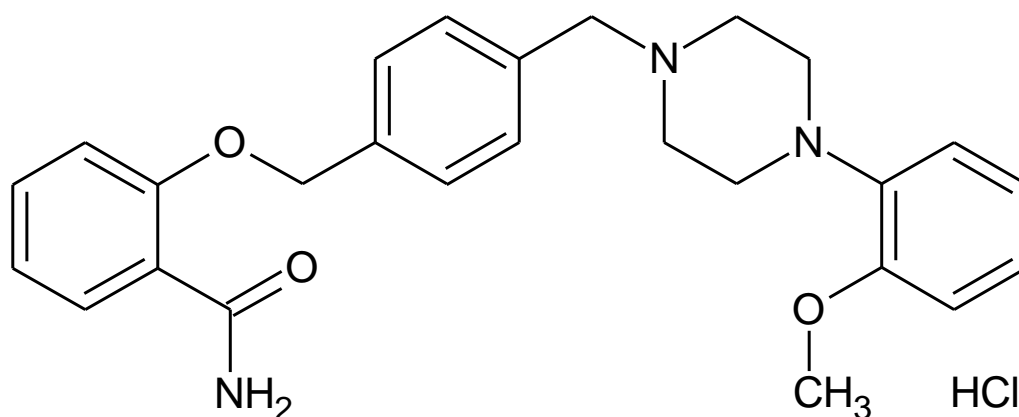
chlorowodorek 2-({6-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]heksylo}oksy)benzamidu



Ryc. 3.7 Wzór strukturalny związku JJGW11

JJGW11

chlorowodorek 2-[(3-{[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]metylo}fenylo)metoksy]benzamidu



Ryc. 3.8 Wzór strukturalny związku JJGW12

JJGW12

chlorowodorek 2-[(4-{[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]metylo}fenylo)metoksy]benzamidu

3.2 Związki odniesienia

W przeprowadzonych badaniach, w zależności od eksperymentu użyto następujących związków odniesienia:

- Aripiprazolu
- Diazepamu
- Klozapiny
- Mianseryny
- Moklobemidu
- Olanzapiny

3.3 Leki i odczynniki

Podczas wykonywanych eksperymentów stosowano poniższe leki i odczynniki:

- [³H]-8-OH-DPAT (aktywność specyficzna 106 Ci/mmol, Perkin Elmer, USA)

- [³H]-ketanseryna (aktywność specyficzna 60 Ci/mmol, Perkin Elmer, USA)
- [³H]-klonidyna (aktywność specyficzna 70,5 Ci/mmol, NEN Life Science Products, USA)
- [³H]-LSD (aktywność specyficzna 250 Ci/mmol, Perkin Elmer, USA)
- [³H]- metylspiperon (aktywność specyficzna 250 Ci/mmol, Perkin Elmer, USA)
- [³H]-prazosyna (aktywność specyficzna 19,5 Ci/mmol, NEN Life Science Products, USA)
- 1% roztwór Tween 80 (*Tween 80*, J.T.Baker, Wielka Brytania)
- (+)-Butaklamol ((+)-*Butaclamol hydrochloride*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- α-metyloserotonina (*α-methylserotonin maleate*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Amfetamina (*Amphetamine hydrochloride*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Apomorfina (*Apomorphine hydrochloride hemihydrate*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Aripiprazol (*Aripiprazole*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Chlorek magnezu (*Magnesium chloride*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Chlorek sodu 0,9% roztwór (*Natrii chloratum 0,9% inj.*, Polpharma, Polska)
- Chlorek wapnia (*Calcii chloridum anhydricum*, P.O.Ch. S.A., Polska)
- Diazepam (*Diazepamum*, Tocris Bioscience, Wielka Brytania)
- Dizocylpina (MK-801) (*Dizocilpine hydrogen maleate*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Fentolamina (*Phentolamine hydrochloride*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Haloperidol (*Haloperidol*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Heparyna (*Heparin sodium inj. 25000 j.m./ml*, Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A., Polska)
- HEPES (*Hepes solution*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Ketanseryna (*Ketanserin (+)-tartrate*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Klonidyna (*Clonidine hydrochloride*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Klozapina (*Clozapine*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Mianseryna (*Mianserin hydrochloride*, Tocris Bioscience, USA)
- Metiotepina (*Methiothepine mesylate salt*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Metoksamina (*Methoxamine hydrochloride*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Moklobemid (*Moclobemide*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Olanzapina (*Olanzapine*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Quinpirol ((-)-*Quinpirole hydrochloride*, Sigma-Aldrich, Niemcy)

- Serotonina (*Serotonin hydrochloridum*, Tocris Bioscience, USA)
- Tiopental (*Thiopentalum natricum*, Sandoz GmgH, Austria)
- TRIS (*Tris(hydroxymethyl)aminomethan*, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Woda do iniekcji (*Aqua pro injectione inj. 10 ml*, Polpharma, Polska)

3.4 Zwierzęta

Badania przeprowadzono na myszach samcach rasy Swiss Albino (Krf:CD-1), o masie ciała 18-25 g oraz szczurach normotensyjnych szczepu Wistar (Krf:(WI) WU), o masie ciała 170-350 g. Zwierzęta trzymano w standardowych klatkach odpowiednich do ich rozmiarów (po 10 myszy i po 4 szczury w jednej klatce), w pomieszczeniu o temperaturze 20-24°C, z 12-godzinnym cyklem świetlnym. Karmione były standardową paszą granulowaną przeznaczoną dla zwierząt laboratoryjnych i pojone filtrowaną wodą wodociągową w dowolnych ilościach. Grupy badane liczyły w zależności od eksperymentu 8-10 myszy lub 6-8 szczurów. Wszystkie eksperymenty wykonane w ramach niniejszej pracy badawczej uzyskały akceptację I i II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (uchwały nr 262/2015, 102/2016, 170/2018) oraz II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW w Warszawie (uchwała nr WAW2/130/2018).

3.5 Aparatura

W przeprowadzonych badaniach stosowano poniższą aparaturę:

- Aktometry - klatki do pomiaru ruchliwości z wbudowaną fotokomórką firmy Opto M3
- Aparat do pomiaru ciśnienia tętniczego u małych zwierząt - DATAMAX-BPL-8 (Columbus Instruments, Ohio, USA)
- Aparat do testu czterech płytek (Panlab, Hiszpania)
- Aparat Rotarod RR 0711 (MAY, COMMAT Ltd., Turcja)
- Aparat do testu biernego unikania LE872 (Bioseb, Francja)

- Aparat do testu bramkowania przesygnalowego (SR-LAB, San Diego Instruments, San Diego, CA, USA)
- Czytnik mikroplitek EnVision (PerkinElmer, USA)
- Elektrokardiograf Multicard E-30 (Varimex, Polska)
- Elektrokardiograf AsCARD B5 (Aspel S.A., Polska)
- Filtry Whatman GF/B (Whatman, Wielka Brytania)
- Homogenizator ULTRA-TURRAX, T 25 basic (IKA LABORTECHNIK, Niemcy)
- Licznik scyntylacyjny MicroBeta Trilux 1450 (Perkin Elmer, USA)
- Mieszadlo hematologiczne (Wigo, Polska)
- Mikroplutki OptiPlate-96 (Perkin Elmer, USA)
- Miniwirówka MCF 2360 (OMNILAB, Niemcy)
- Myjka ultradźwiękowa Sonic-3 (Polsonic, Polska)
- Oprogramowanie komputerowe GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)
- Płyn scyntylacyjny Ultima Gold MV (Perkin Elmer, USA)
- Płytki inkubacyjne MAFCNOB 10 (Millipore Sp. z o.o., Polska)
- Stacja do pipetowania Rainin Liquidator (MettlerToledo, USA)
- System do pomiaru luminescencji MicroBeta2 LumiJET (Perkin Elmer, USA)
- System do zmywań Harvester-96 (Filtermate Harvester, Perkin Elmer, USA)
- System śledzenia wideo (SMART, Panlab SL, Barcelona, Hiszpania)
- Test immunologiczny LANCE Ultra cAMP (PerkinElmer, USA).
- Uniesiony labirynt krzyżowy (Campden Instruments Ltd, Wielka Brytania)
- Waga analityczna XA110 (Radwag, Polska)
- Wirówka MPW-375 (MPW Med. Instruments, Polska)
- Oprogramowanie aLab (aLab.io)

3.6 Obliczenia statystyczne

Wyniki eksperymentów przedstawiono jako średnie z pomiarów \pm błąd standardowy średniej (\pm SEM). Przy porównywaniu wartości średnich dla kilku różnych badanych grup wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, natomiast dla dwóch grup sparowany test t-Studenta. W przypadku badania wpływu na prawidłowy elektrokardiogram zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji

ANOVA z powtórzonymi pomiarami, a dla badania wpływu na ciśnienie tętnicze krwi, testu bramkowania przed sygnałowego i testu biernego unikania użyto dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z powtórzonymi pomiarami. Do porównania wartości *post hoc* wykorzystano w zależności od eksperymentu test Newman-Keuls's/Dunnett'a/Tukey'a lub test Bonferroni'ego. Różnicę średnich uznawano za znamiennej statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$. W przypadku testu rozpoznawania nowego obiektu przy obliczeniach posłużono się testem t-Studenta dla jednej próby. Analogicznie jak wyżej, różnicę między średnią, a wartością testowaną uznawano za istotną statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$. Minimalną dawkę kataleptogenną określono według metody opisanej przez Ogren'a i współpracowników [219]. W teście rotarod dla każdego związku obliczono wartość ED_{50} [220], tj. dawkę przy której 50% zwierząt nie jest w stanie utrzymać się na kręcącym się pręcie. W przypadku badań wiązania radioligandów, uzyskane dane dopasowano do równania krzywej jednomiejscowej, używając oprogramowania GraphPad Prism 5.0, a wartość K_i (stała inhibicji) oszacowano na podstawie równania Chenga-Prusoffa [221]:

$$K_i = IC_{50} / (1 + (L_0 / K_D))$$

IC_{50} - stężenie związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania hamującego

L_0 – stężenie znakowanego ligandu

K_D - stała dysocjacji znakowanego ligandu

W przypadku badań funkcjonalnych, wartości IC_{50} i EC_{50} (stężenie związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania) określono za pomocą nieliniowej analizy regresji, przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5.0. Wartości K_d (stała równowagi dysocjacji dla kompetycyjnego antagonisty) ustalono za pomocą równania Chenga Prusoffa [221].

4 Metody

4.1 Badania wstępne

Badania *in vitro*

4.1.1 Badanie powinowactwa do receptorów dopaminergicznych D₂, serotoninergicznych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ oraz adrenergicznych α_1 i α_2

Badania radioreceptorowe przeprowadzono z użyciem błon komórkowych linii komórkowej CHO-K1 ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora w przypadku receptorów 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ oraz D₂. W pozostałych oznaczeniach wykorzystano tkankę mózgową szczura, a konkretnie: hipokamp, dla receptorów 5-HT_{1A} i korę mózgową dla receptorów adrenergicznych (Tab. 4.1). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na 96-dołkowych mikro płytках. Każda mieszanina reakcyjna zawierała: 50 μ l odpowiedniego rozcieńczenia badanej substancji, 50 μ l znakowanego trytem liganda w zadanym stężeniu oraz 150 μ l materiału biologicznego, będącego źródłem receptorów. Odpowiednie warunki dla poszczególnych procedur obejmujące: źródło białka receptorowego, znakowane ligandy, wiązania niespecyficzne, wobec których oznaczano powinowactwo, odpowiednie bufony i warunki inkubacji wyszczególniono w Tabeli 4.1. Po inkubacji mieszaninę reakcyjną filtrowano przez filtr z włókna szklanego GF/B za pośrednictwem harwestera do płytek (Filtermate Harvester, Perkin Elmer, USA). Następnie, płytkę filtracyjną przepłukiwano odpowiednim buforem, suszono, zalewano płynem scyntylacyjnym Ultima Gold MV (Perkin Elmer, USA) i dokonywano pomiaru. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylacyjnym MicroBeta Trilux 1450 (Perkin Elmer, USA). Wszystkie badane substancje oznaczano w dwukrotnych powtórzeniach. Wyniki obliczono metodą regresji nieliniowej przy użyciu programu GraphPad Prism.

Tab. 4.1 Warunki oznaczeń radioreceptorowych

Receptor	Źródło białka receptorowego	Radioligand	Wiązanie niespecyficzne	Bufor	Warunki inkubacji
D ₂	Komórki ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora D ₂	[³ H]-metylspiperon (stężenie końcowe 0,4 nM)	10 μM (+)-butaklamol	NHME	60 min, 30°C
5-HT _{1A}	Hipokamp szczura	[³ H]-8-OH-DPAT (stężenie końcowe 1,0 nM)	10 μM serotonina	50mM Tris-HCl pH 7,7	20 min, 37°C
5-HT _{2A}	Komórki ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora 5-HT _{2A}	[³ H]-ketanseryna (stężenie końcowe 1,0 nM)	1 μM ketanseryna	50mM Tris-HCl pH 7,4 4mM CaCl ₂	60 min, 27°C
5-HT ₆	Komórki ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora 5-HT ₆	[³ H]-LSD (stężenie końcowe 1,0 nM)	10 μM metiotepina	50mM Tris-HCl pH 7,4 10mM MgCl ₂ 0,5mM EDTA	60 min, 37°C
5-HT ₇	Komórki ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora 5-HT ₇	[³ H]-LSD (stężenie końcowe 3,0 nM)	10 μM metiotepina	50mM Tris-HCl pH 7,4 10mM MgCl ₂ 1mM EDTA	60 min, 30°C
α ₁	Kora mózgowa szczura	[³ H]-prazosyna (stężenie końcowe 0,2 nM)	10 μM fentolamina	50mM Tris-HCl pH 7,6	30 min, 30°C
α ₂	Kora mózgowa szczura	[³ H]-klonidyna (stężenie końcowe 2,0 nM)	10 μM klonidyna	50mM Tris-HCl pH 7,6	25 min, 30°C

4.1.2 Badanie aktywności wewnętrznej wobec receptorów dopaminergicznych D₂ oraz serotoninergetycznych 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}

Wykonane analizy funkcjonalne oceniające wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia wykorzystują enzym ekworynę, wrażliwą na ich stężenie – metoda AequoScreen (Perkin Elmer). Forma nieaktywna enzymu – apoekworyna, aby móc przekształcić się w formę aktywną potrzebuje grup prostetycznych (koelenterazyna h). W wyniku aktywacji apoekworyny dochodzi do związania jonów wapnia, oksydacji koelenterazyny w koelenteramid, produkcji dwutlenku węgla oraz emisji światła. Natężenie światła mierzone luminescencyjnie w trybie szybkiej kinetyki jest proporcjonalne do stężenia jonów wapnia. Badania te przeprowadzono według protokołu dostarczonego przez producenta.

Związki badane i referencyjne rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO) w stężeniu 1 mM. W płytce 96-dółkowej wykonano od 8 do 10 seryjnych rozcieńczeń związków badanych. Badanie aktywności wewnętrznej związków wykonano przy użyciu linii komórkowej CHO-K1, ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora sprzężonego z konkretnym białkiem G w zależności od rodzaju receptora: dla receptora D₂ białko G $\alpha_{qi}/5$, a dla receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} białko G α_{16} (Tab. 4.2). Warunki dla poszczególnych procedur obejmujące: rodzaj sprzężonego białka G, stężenie komórek oraz rodzaj i stężenie referencyjnego agonisty przedstawiono w Tabeli 4.2.

Po rozmrożeniu komórki przeniesiono do medium DMEM/HAMF12 z dodatkiem 0,1% albuminy wolnej od proteaz (BSA) i odwirowano. Pellet komórkowy ponownie zawieszono w medium z dodatkiem koelenterazyny h w końcowym stężeniu 5 μ M. Zawiesinę komórek inkubowano w 16°C w ciemności, ciągle mieszając za pomocą mieszadła hematologicznego. Następnie komórki rozcieńczono medium DMEM/HAMF12 z dodatkiem 0,1% BSA do odpowiedniego stężenia (Tab. 4.2) i dodatkowo inkubowano 1 h w 16°C, ciągle mieszając. Do dołków mikropłytki 96-dółkowej typu Optiplate naniesiono 50 μ l związku badanego i zadozowano 50 μ l zawiesiny komórek przy użyciu urządzenia MicroBeta2 LumiJET (PerkinElmer, USA), a następnie wykonano pomiar luminescencji przez 30-60 sekund. W trybie antagonisty po 15-60 minutach inkubacji w zależności od typu receptora, do zawartości dołka badanej płytki dodano agonistę w stężeniu równym EC₈₀ i ponownie rejestrowano natężenie sygnału (Tab. 4.2) Wyniki przeprowadzonych eksperymentów zostały

poddane szczegółowej analizie przy użyciu programu GraphPad Prism z wyznaczeniem należytych wartości (EC_{50} , IC_{50} , SD, SEM, Kb).

Tab. 4.2 Parametry analiz funkcjonalnych metodą AequoScreen w zależności od rodzaju receptora

Receptor	Sprężone białko G	Stężenie komórek	Referencyjny agonista
D ₂	G α i/5	250 000/ml	Quinpirol (8 nM)
5-HT _{1A}	G α 16	100 000/ml	Serotonina (100 nM)
5-HT _{2A}	G α 16	100 000/ml	α -metyloserotonina (30 nM)

4.1.3 Badanie aktywności wewnętrznej wobec receptorów serotonergicznym 5-HT₇

Związki badane i referencyjne rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO) w stężeniu 1 mM. W płytce 96-dołkowej wykonano od 8 do 10 seryjnych rozcieńczeń związków badanych. Badanie aktywności wewnętrznej związków wykonano przy użyciu linii komórkowej CHO-K1, ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora 5-HT₇ sprzężonego z białkiem G oraz genem reporterowym beta-laktamazy (bla) pod kontrolą CRE (ang. *cAMP responsive element*), który odpowiada na poziom cyklicznego AMP (cAMP) (Life Technologies). Wpływ związków na aktywność cykazy adenylationowej, tym samym wtórnego przekaźnika informacji jakim jest cAMP, został zbadany przy użyciu homogennej metody TR-FRET LANCE Ultra cAMP (Perkin Elmer). Zasada metody oparta jest o współzawodnictwo pomiędzy cAMP znakowanym a wolnym. Test przeprowadzono zgodnie ze standardowym protokołem dostarczonym przez producenta.

Rozmrożone komórki zawieszono w buforze stymulacyjnym (HBSS, 5 mM HEPES, 0,5 IBMX i 0,1% BSA, pH 7,4), zwirowano, a pellet komórek rozcieńczono powyższym buforem do stężenia 200 000 komórek/ml. 10 μ l zawiesiny komórek dodano do 10 μ l związków badanych. Analizy wykonywano przy użyciu 96-dołkowej mikropłytki ze zmniejszoną o połowę powierzchnią dołka. Potencjalną odpowiedź agonistyczną związków sprawdzono w układzie eksperymentalnym: związek oraz komórki. Badanie odpowiedzi antagonistycznej związku sprawdzano poprzez dodanie serotoniny w stężeniu końcowym 10 nM (EC_{80}). Zawartość płytki inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej (22°C). W następnym etapie badań, do zawartości

dołków płytki analitycznej dodano 10 μ l odczynnika EucAMP Tracer i 10 μ l ULight-anti-cAMP, dokładnie wymieszano, inkubowano przez 1 h także w temperaturze pokojowej (22°C). Do odczytania wyników wykorzystano czytnik mikropłytek EnVision (PerkinElmer, USA). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów zostały poddane szczegółowej analizie przy użyciu programu GraphPad Prism z wyznaczeniem należytych wartości (EC_{50} , IC_{50} , SD, SEM).

Badania radioreceptorowe i aktywności wewnętrznej zostały wykonane w Pracowni Badań Receptorowych Katedry Farmakobiologii Wydziału Farmaceutycznego UJ CM pod kierunkiem Prof. dr hab. Gabriela Nowaka.

Badania *in vivo*

4.1.4 Ocena potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 u myszy

Test wykonano według metody opisanej przez Irifune i wsp. [222] z drobnymi modyfikacjami. Ruchliwość zwierząt mierzono w aktometrach tj. w plastikowych klatkach Opto M3 o wymiarach 22 x 12 x 13 cm, połączonych z komputerem zaopatrzonym w program MultiDevice Software v. 1.30 firmy Columbus Instruments. Klatki doświadczalne wyposażone zostały w źródła podczerwieni po jednej ze stron oraz czujniki odbierające wysyłane promienie, umieszczone po drugiej stronie klatki. Przekroczenie przez zwierzę każdej wiązki promieni podczerwonych było kwalifikowane jako aktywność ruchowa (ambulacja). Zwierzęta umieszczano w klatkach doświadczalnych pojedynczo, bezpośrednio po podaniu badanych związków na 30 minut przed rozpoczęciem testu, w celu adaptacji do nowych warunków i wykluczenia występowania nadruchliwości spowodowanej zmianą otoczenia. Pomiar spontanicznej aktywności lokomotorycznej wykonywano co 5 minut przez 60 minut.

Myszy otrzymywały dwie iniekcje dootrzewnowo (*i.p.*): związek badany lub substancję odniesienia (30 minut przed testem) oraz MK-801 (15 minut przed testem) w dawce 0,2 mg/kg [223]. Grupy kontrolne otrzymywały odpowiednio iniekcję rozpuszczalnika (0,9% NaCl lub 1,0% Tween w przypadku substancji odniesienia) i MK-801 lub dwie iniekcje rozpuszczalnika (0,9% NaCl lub 0,9% NaCl i 1,0% Tween

w przypadku substancji odniesienia). Badane związki podawano dootrzewnowo w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg. Jeżeli związek podany w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszano o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto olanzapiny, którą podawano dootrzewnowo w dawkach 0,01, 0,03 oraz 0,3 mg/kg. Wszystkie badane związki lub 0,9% roztwór NaCl/1,0% Tween (grupa kontrolna) podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.1.5 Ocena potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem amfetaminy u myszy

Test wykonano według metody opisanej przez O'Neill i wsp. [224] z drobnymi modyfikacjami. Ruchliwość zwierząt mierzono analogicznie jak opisano w podrozdziale 4.1.4.

Myszy otrzymywały dwie iniekcje: dootrzewnowo związek badany lub substancję odniesienia (30 minut przed testem) oraz podskórną (*s.c.*) amfetaminę (30 minut przed testem) w dawce 2,5 mg/kg [225]. Grupy kontrolne otrzymywały odpowiednio iniekcję rozpuszczalnika dootrzewnowo (0,9% NaCl lub 1,0% Tween w przypadku substancji odniesienia) i amfetaminę podskórną lub dwie iniekcje rozpuszczalnika (jedną dootrzewnowo i drugą podskórną) (0,9% NaCl lub 0,9% NaCl (*s.c.*) i 1,0% Tween (*i.p.*) w przypadku substancji odniesienia). Badane związki podawano w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg. Jeżeli związek podany w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszano o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto olanzapiny, którą podawano dootrzewnowo w dawkach 0,01, 0,03 oraz 0,3 mg/kg. Wszystkie badane związki lub 0,9% roztwór NaCl/1,0% Tween (grupa kontrolna) podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.1.6 Ocena potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej w teście wymuszonego pływania u myszy

Test wymuszonego pływania (ang. *forced swimming test*, FST, Test Porsolt'a) u myszy wykonywano według metody opisanej przez Porsolt'a i wsp. [226]. Myszy umieszczano pojedynczo w szklanych cylindrach o wysokości 25 cm i średnicy 10 cm, wypełnionych wodą o temperaturze $24 \pm 1^\circ\text{C}$ do wysokości 10 cm. Zwierzęta pozostawiano w wodzie na czas 6 minut. Po 2-minutowym okresie adaptacji, gdzie mysz wykazywała wzmożoną aktywność ruchową, związaną z próbami wydostania się, przez kolejne 4 minuty mierzono czas bezruchu myszy, a także czas pływania i wspinania. Jako bezruch przyjęto charakterystyczną semihoryzontalną postawę, kiedy mysz nie poruszała się lub wykonywała minimalne ruchy w celu utrzymania głowy nad powierzchnią wody. Eksperymenty rejestrowano i oceniano przy użyciu oprogramowania aLab.io przez doświadczonego, zaślepiętego obserwatora.

Wszystkie badane związki podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg. Jeżeli związek podany w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszano o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto mianseryny, którą podawano dootrzewnowo w dawkach 5,0 i 10,0 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały 0,9% roztwór NaCl. Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.1.7 Ocena potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej w teście zawieszania za ogon u myszy

Test zawieszania za ogon (ang. *tail suspension test*, TST) wykonano według metody opisanej przez Steru i wsp. [227]. Myszy zawieszano indywidualnie za ogon za pomocą taśmy samoprzylepnej o szerokości 1 cm, 70 cm od podłoża. Podczas 6 minut trwania testu, mierzono czas bezruchu, czyli bezwładną pozycję ciała zwierzęcia. Eksperymenty zostały wykonane i ocenione przez doświadczonego, zaślepiętego obserwatora.

Badane związki podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg. Jeżeli związek podany

w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszono o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto moklobemid, który podawano dootrzewnowo na 60 minut przed testem, w dawkach 10 i 20 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały 0,9% roztwór NaCl. Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.1.8 Ocena potencjalnej aktywności przeciwłękowej w teście czterech płytek u myszy

Test wykonano według metody opisanej przez Aron'a i wsp. [228]. Myszy umieszczano pojedynczo w aparacie, będącym klatką z nieprzezroczystego plastiku (18 cm x 25 cm x 16 cm) z zamocowanymi w podłodze czterema stalowymi płytkami (8 cm x 11 cm), oddzielonymi od siebie 4 mm szczeliną. Płytki te podłączone były do generatora nieuszkodzających impulsów elektrycznych (0,5 mA, 0,5 s). Po 15-sekundowym okresie aklimatyzacji, w ciągu następnych 60 sekund myszy karano elektrowstrząsem, przy przechodzeniu z jednej płytki na drugą, przy czym przerwa pomiędzy kolejnymi bodźcami wynosiła co najmniej 3 sekundy (okres bezpieczny). Kryterium oceny działania przeciwłękowego była liczba przekroczeń karanych prądem elektrycznym (za przejście uznawano 2 kończyny na jednej i 2 kończyny na innej płytce).

Badane związki podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg. Jeżeli związek podany w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszono o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwłękowej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto diazepam, który podawano dootrzewnowo na 60 minut przed testem, w zakresie dawek 0,625-10 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały 0,9% roztwór NaCl. Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.1.9 Ocena potencjalnej aktywności przeciwłękowej w teście uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy

Test uniesionego labiryntu krzyżowego (opisany pierwotnie przez Lister'a [36]) przeprowadzono według metodyki określonej przez Sałat i wsp. [37]. Uniesiony labirynt krzyżowy składa się z przeciwstawnie umiejscowionych dwóch ramion otwartych ($30\text{ cm} \times 5\text{ cm}$) i dwóch zamkniętych ($30\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 25\text{ cm}$) połączonych centralną platformą ($5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$), co w całości tworzy kształt znaku plus. Myszy umieszczano pojedynczo w centralnym polu aparatu, z głową zwróconą w kierunku jednego z ramion zamkniętych. Zachowanie zwierząt obserwowano przez 5 minut. Po każdej myszy urządzenie dezynfekowano 70° etanolem. Mierzono liczbę wejść zwierzęcia do ramion otwartych i zamkniętych, a także czas spędzony w ramionach otwartych i zamkniętych labiryntu. Eksperymenty rejestrowano i oceniano przy użyciu oprogramowania aLab.io przez doświadczonego, zaślepionego obserwatora.

Wszystkie badane związki podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg. Jeżeli związek podany w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszano o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwłękowej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto diazepam, który podawano dootrzewnowo w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały 0,9% roztwór NaCl. Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.1.10 Ocena wpływu badanych związków na ruchliwość spontaniczną u myszy

Ruchliwość spontaniczną myszy mierzono w specjalnych klatkach, zwanych aktometrami, opisanych w podrozdziale 4.1.4. Przekroczenie przez zwierzę wiązki promieni, kwalifikowano jako aktywność ruchową. Myszy umieszczano w klatkach pojedynczo, bezpośrednio po podaniu badanych związków na okres 30 minut. Po okresie adaptacji rejestrowano ilość wykonywanych ruchów w odpowiednich przedziałach czasowych (60 minut dla testu hiperlokomocji, 4 minuty dla testu wymuszonego pływania, 6 minut dla testu zawieszania za ogon, 1 minuta dla testu czterech płytek i 5 minut dla testu uniesionego labiryntu krzyżowego).

Badane związki lub 0,9% roztwór NaCl (grupa kontrolna) podawano dootrzewnowo w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała. Eksperyment ten wykonano w celu wykluczenia wyników fałszywie dodatnich uzyskanych w przeprowadzonych wcześniej testach.

4.1.11 Ocena wpływu badanych związków na zdolność indukowania katalepsji u myszy

Katalepsję oceniano stosując metodę metalowego pręta, opisaną przez Ueki i wsp. [229] z drobnymi modyfikacjami. Tylne łapy myszy pozostawiano na poziomym blacie, natomiast przednie łapy umieszczano na cylindrycznym metalowym pręcie usytuowanym 4 cm nad powierzchnią blatu. Mierzono czas utrzymywania przez zwierzę obu łap na pręcie po 30, 60 i 120 minutach po podaniu związków, przy czym maksymalny czas pomiaru wynosił 60 sekund. Każdy z pomiarów obejmował trzykrotne stawianie łap zwierzęcia na pręcie chyba, że mysz przebywała na nim przez 60 sekund, wówczas nie przeprowadzano kolejnej próby. Wynik dla każdej próby oceniano w następujący sposób: 0 punktów jeśli zwierzę utrzymywało wymuszoną pozycję <15 sekund, 1 punkt za utrzymywanie się na pręcie przez 15-29,9 sekund, 2 punkty za utrzymywanie się przez 30-59,9 sekund oraz 3 punkty za pozostawanie na pręcie ≥ 60 sekund. Minimalną dawką kataleptogenną określono najniższą dawkę indukującą średni wynik katalepsji >1 w 30, 60 i/lub 120 minucie po podaniu związków [219].

Wszystkie badane związki podawano dootrzewnowo w zakresie dawek 5,0-20,0 mg/kg w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

Test katalepsji oraz opisane powyżej testy hiperlokomocji po podaniu MK-801 i amfetaminy przeprowadzono w Zakładzie Farmacji Klinicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, dzięki uprzejmości Prof. dr hab. Anny Wesołowskiej.

4.1.12 Ocena wpływu badanych związków na koordynację ruchową myszy w teście rotarod

Wpływ badanych związków na koordynację ruchową oceniano w teście „rotarod” według Dunham i Miya [230]. Myszy trenowano przez 3 dni, umieszczając je indywidualnie na pręcie o średnicy 11 cm, obracającym się z szybkością 24 rpm. Podczas każdej sesji treningowej zwierzęta pozostawiano na pręcie przez 3 minuty. W dniu eksperymentu, który następował co najmniej 24 h po ostatniej sesji treningowej, myszom podawano badane związki, a po upływie 30 minut umieszczano indywidualnie na kręcącym się pręcie (szybkość: 24 rpm) na okres 60 sekund. W trakcie eksperymentu rejestrowano czas, przez który zwierzę zdoła utrzymać się na pręcie. Dla każdego związku obliczono wartość ED₅₀ [220], tj. dawkę przy której 50% zwierząt nie jest w stanie utrzymać się na kręcącym się pręcie.

Badane związki podawano dootrzewnowo w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

Badania weryfikujące wpływ na układ sercowo-naczyniowy

4.1.13 Ocena wpływu na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnych szczurów

Ciśnienie tętnicze krwi mierzono u normotensyjnych, znieczulonych tiopentalem (75 mg/kg, *i.p.*) szczurów w tętnicy szyjnej wspólnej, przy pomocy aparatu do pomiaru ciśnienia krwi u małych zwierząt typu DATAMAX. Po 15-minutowym okresie stabilizacji, zwierzętom podawano dożylnie (*i.v.*) badane związki w stałej objętości 1,0 ml/kg. Ciśnienie mierzono przed podaniem oraz po 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 i 60 minutach od podania związku. Wszystkie badane związki podawano wyjściowo w dawce 5 mg/kg. Jeżeli stwierdzono aktywność hipotensyjną, dawkę zmniejszono o połowę, aż do zaniku aktywności hipotensyjnej, bądź wyników nieistotnych statystycznie.

4.1.14 Ocena wpływu na presyjne działanie metoksaminy

Badania wykonano na normotensyjnych szczurach, znieczulonych tiopentalem (75 mg/kg, *i.p.*). Ciśnienie tętnicze krwi mierzono w tętnicy szyjnej wspólnej (według metody opisanej w podrozdziale 4.1.13). Po kontrolnym zapisie ciśnienia tętniczego podawano dożylnie (*i.v.*) metoksaminę (150 µg/kg), a następnie badane związki w stałej objętości 1,0 ml/kg. Po 5 minutach od podania badanego związku ponownie podawano metoksaminę, rejestrując wartości ciśnienia tętniczego. Przy ocenie wyników brano pod uwagę przyrosty ciśnienia skurczowego indukowane podawaniem metoksaminy przed i po podaniu badanego związku. Badane związki podawano w najniższej dawce obniżającej ciśnienie tętnicze krwi.

4.1.15 Ocena wpływu na prawidłowy elektrokardiogram u szczurów

Badania elektrokardiograficzne (EKG) wykonano aparatem typu Multicard E-30 oraz AsCARD B5, stosując odprowadzenie dwubiegunowe II, przy szybkości przesuwu taśmy 50 mm/sek. i kalibracji napięcia 1 mV=1 cm. Szczurom znieczulonym ogólnie (tiopental, 75 mg/kg, *i.p.*) po wykonaniu elektrokardiogramów kontrolnych, podawano dożylnie (*i.v.*) badane związki w jednej dawce 5 mg/kg i w stałej objętości 1,0 ml/kg. Zapisu EKG dokonywano powtórnie po upływie 1, 5, 10 i 15 minut od momentu podania związku. Oceniano wpływ na wybrane parametry pracy serca szczura takie jak: częstotliwość (RR), czas trwania odstępów: PR, QT oraz zespołu QRS. Ze względu na fakt, iż spadek częstotliwości pracy serca koreluje z wydłużeniem odstępu QT, jako najbardziej miarodajną ocenę tego parametru przyjęto tzw. kalkulowany odstęp QT (QTc) uwzględniający częstość rytmu serca i wyliczony przy użyciu wzoru Bazzezza [231]:

$$QTc = QT/\sqrt{RR}$$

gdzie:

RR - częstotliwość pracy serca

4.2 Rozszerzone badania farmakologiczne dla wyselekcjonowanych związków: JJGW07 i JJGW08

4.2.1 Ocena potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów

Eksperyment przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Acewicza i wsp. [232]. Potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną oceniano poprzez zdolność do hamowania hiperaktywności zwierząt, wywołanej podaniem antagonisty receptora NMDA, MK-801 [233]. W tym celu, grupy szczurów przeniesiono w ich klatkach bytowych do pomieszczenia eksperymentalnego na 24 h przed wykonywaniem testu i umożliwiono habituację przez 30 minut, a następnie z powrotem przeniesiono do pomieszczenia bytowania. Habituację przeprowadzono w celu poznania otoczenia, przyzwyczajania do warunków eksperymentalnych, szumu komputera, światła oraz zmniejszenia stresu podczas badania. Test otwartego pola przeprowadzono następnego dnia w dźwiękoszczelnym pomieszczeniu eksperymentalnym, oświetlonym rozproszonym światłem o natężeniu około 20 luksów i wyposażonym w źródło białego szumu o natężeniu około 65 dB. Aktywność lokomotoryczną zwierząt mierzono w metalowej ośmiokątnej arenie z czarną podłogą o średnicy 80 cm, otoczonej czarną ścianą o wysokości 50 cm. Każde zwierzę było umieszczane indywidualnie w centralnym sektorze areny, o średnicy 50 cm i pozostawiane w celu eksploracji, bez kontaktu wzrokowego z innymi badanymi szczurami. Pokonany dystans (w cm) monitorowano w 10-minutowych interwałach przez 30 minut, za pomocą skomputeryzowanego systemu śledzącego ruch i zachowanie zwierząt (SMART, Panlab SL, Barcelona, Hiszpania).

Wyselekcjonowane związki tj. JJGW07 i JJGW08 podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w zakresie dawek 0,3-30,0 mg/kg. Na 15 minut przed rozpoczęciem testu szczurom podawano dootrzewnowo dodatkowo MK-801 w dawce 0,3 mg/kg [234]. Jeżeli związek podany w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszano o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto kłozapiny, którą podawano dootrzewnowo na 60 minut przed testem, w zakresie dawek 3,0-30,0 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały

dootrzewnowo dwie iniekcje: 0,9% roztwór NaCl 30 minut przed testem (lub 1,0% Tween 60 minut przed testem w przypadku klozapiny) oraz MK-801 15 minut przed eksperymentem. Badane związki podawano w stałej objętości 2,0 ml/kg masy ciała, klozapinę w objętości 3,0 ml/kg, natomiast MK-801 w objętości 1,0 ml/kg masy ciała.

4.2.2 Ocena potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście bramkowania przed sygnałowego po podaniu MK-801 u szczurów

Poniższy test przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Acewicza i wsp. [235]. Aparatura do pomiaru reakcji bramkowania przed sygnałowego (PPI, ang. *prepulse inhibition*) obejmuje 8 identycznych dźwiękoszczelnych kabin wyposażonych w aparaty, składające się z plastikowych, przezroczystych klatek z głośnikiem umieszczonym od góry (SR-LAB, San Diego Instruments, San Diego, CA, USA). Każda klatka ma 33 cm szerokości, 33 cm głębokości i 48 cm wysokości. Dno każdej klatki stanowi ruchoma platforma połączona z czujnikiem, rejestrującym ruchy podłoża. Czujniki są wrażliwe tylko na ruchy pionowe zwierząt (góra, dół), co zapewnia pomiar wyłącznie amplitudy reakcji wzdygnięcia („*startle*”) i nie powoduje obciążenia artefaktami związanymi z ruchliwością zwierząt. Czujniki przetwarzają zarejestrowany pionowy ruch na sygnał elektryczny, potęgowany następnie przez wzmacniacz i przenoszony przez konwerter analogowo-cyfrowy do komputera. Program komputerowy (SR-LAB) rejestruje amplitudę reakcji „*startle*”, definiowanej jako: różnica pomiędzy maksymalną siłą nacisku wywieraną przez szczura w momencie reakcji „*startle*” na dno klatki, a siłą nacisku mierzoną bezpośrednio przed zastosowaniem bodźca akustycznego, przy progu czułości 20 g. Reakcja zwierzęcia na bodziec akustyczny, przewyższająca siłę 20 g, wywołuje automatycznie pomiar amplitudy reakcji „*startle*”.

Przed eksperymentem zwierzęta adaptowano do klatek eksperymentalnych przez 5 minut, przy białym szumie tła o natężeniu 70 dB. W celu habituacji do warunków eksperymentu szczury na początku badania otrzymały trzy pulsy o natężeniu 120 dB. Sesja eksperymentalna składała się z zaprogramowanych zdarzeń, ze ściśle określonymi parametrami: czas trwania pulsu 40 ms (120 dB), czas trwania prepulsu 20 ms (84 i 90 dB), czas od rozpoczęcia prepulsu do czasu rozpoczęcia pulsu 100 ms, przy białym szumie tła o natężeniu 70 dB. Odstęp pomiędzy kolejnymi zdarzeniami losowymi

wynosił średnio 22,5 sekund (15-30 sekund). Każde badanie składało się z 10 zdarzeń/cykl każdego typu, przeprowadzanych naprzemiennie (losowo). Zdolność do odwracania deficytów bramkowania sensomotorycznego, wywołanego podaniem MK-801, świadczy o potencjalnych właściwościach przeciwpsychotycznych związku. Miarą procesu bramkowania sensomotorycznego była zdolność hamowania reakcji „startle”, wywołanej bodźcem akustycznym o dużym natężeniu, przez słaby bodziec akustyczny. Mierzono intensywność wzdrygnięcia dla każdego bodźca użytego w sesji. Nieoczekiwane reakcje na trzy początkowe bodźce zostały wyłączone z analiz statystycznych. Hamowanie reakcji „startle”, określane skrótem PPI, wyrażane procentowo, wyliczano według wzoru:

$$((PA-PPA) / PA) \times 100 \%$$

gdzie:

PA - amplituda reakcji „startle” po zadziałaniu mocnego bodźca akustycznego (120 dB, 40 ms)

PPA- amplituda reakcji „startle” po zastosowaniu mocnego bodźca akustycznego, poprzedzonego słabym bodźcem (84 i 90 dB, 20 ms)

Wyselekcjonowane związki tj. JJGW07 i JJGW08 podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w dawkach 3,0-30,0 mg/kg. Na 15 minut przed rozpoczęciem testu szczurom podawano dootrzewnowo dodatkowo MK-801 w dawce 0,6 mg/kg (dawka wyznaczona eksperymentalnie). Jeżeli związek podany w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszano o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto kłozapiny, którą podawano dootrzewnowo na 60 minut przed testem, w zakresie dawek 3,0-30,0 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały dootrzewnowo dwie iniekcje: 0,9% roztwór NaCl 30 minut przed testem (lub 1,0% Tween 60 minut przed testem w przypadku kłozapiny) oraz MK-801 15 minut przed eksperymentem. Badane związki podawano w stałej objętości 2,0 ml/kg masy ciała, kłozapinę w objętości 3,0 ml/kg, natomiast MK-801 w objętości 1,0 ml/kg masy ciała.

Test otwartego pola oraz test bramkowania przed sygnałowym zostały wykonane w Instytucie Psychiatrii i Neurologii w Warszawie pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Pawła Mierzejewskiego.

4.2.3 Ocena potencjalnej aktywności przeciwłękowej w teście zagrzebywania u myszy

Test przeprowadzono w oparciu o metodę opisaną przez Broekkamp'a i wsp. [236] z drobnymi modyfikacjami. Myszy umieszczano indywidualnie w klatkach z tworzywa sztucznego, identycznych do ich klatek bytowych, zawierających 5 cm warstwę ściółki i 20 szklanych kulek (o średnicy 1,6 cm) ułożonych równomiernie, w układzie 4 x 5 kulek. Po 30 minutach trwania eksperymentu myszy usunięto z klatek i zliczano liczbę zagrzebanych kulek przynajmniej do 2/3 ich wielkości. Środki o właściwościach uspokajających powodują zmniejszenie ilości zagrzebanych kulek w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wyselekcjonowane związki tj. JJGW07 i JJGW08 podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie u myszy. Jeżeli związek podany w najniższej dawce wykazał aktywność w teście, dawkę zmniejszano o połowę, aż do zaniku potencjalnej aktywności przeciwłękowej, bądź wyników nieistotnych statystycznie. Jako związku odniesienia użyto aripiprazolu, który podawano dootrzewnowo na 30 minut przed testem, w zakresie dawek 0,625-5,0 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały 0,9% roztwór NaCl lub 1,0% Tween w przypadku aripiprazolu. Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.2.4 Ocena wpływu na funkcje kognitywne w teście biernego unikania u myszy

Test biernego unikania u myszy przeprowadzono według metody opisanej przez Lee i wsp. [237] z drobnymi modyfikacjami [238]. Aparat do testu biernego unikania składa się z dwóch komór oddzielonych automatycznymi drzwiami przesuwными (LE872, Bioseb, Francja). Podczas sesji nabywania myszy umieszczano indywidualnie w oświetlonej, białej komorze (20 cm × 21 cm × 20 cm, 1000 lx) z zamkniętymi drzwiami do mniejszej ciemnej komory (7,3 cm × 7,5 cm × 14 cm, 10 lx), wyposażonej

w podłogę z siecią elektryczną (pręty ze stali nierdzewnej, przez które dostarczany jest impuls elektryczny). Po 30 sekundach drzwi do mniejszej komory zostały otwarte. Natychmiast po przejściu myszy do mniejszej ciemnej komory drzwi zamykały się i zwierzę zostało ukarane nieuniknionym wstrząsem elektrycznym (0,8 mA, 2 s). Myszy, które nie przeszły do ciemniejszej komory w ciągu 50 sekund zostały wykluczone z badania. Następnego dnia (24 h później) przetrenowane zwierzęta umieszczono ponownie w oświetlonej komorze i mierzono czas latencji, przez maksymalnie 300 sekund (sesja odtwarzania). Procedura była podobna do sesji nabywania, z tą różnicą, że zwierzęta nie otrzymywały już impulsu elektrycznego po przejściu do mniejszej ciemnej komory. Myszy, które unikały ciemnej komory przez 300 sekund traktowano jako pamiętające zadanie.

Wyselekcjonowane związki tj. JJGW07 i JJGW08 podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem (przed sesją nabywania), w dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie. Jako związku odniesienia użyto aripiprazolu, który podawano dootrzewnowo na 30 minut przed testem, w zakresie dawek 0,25-2,0 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały 0,9% roztwór NaCl lub 1,0% Tween w przypadku aripiprazolu. Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.2.5 Ocena wpływu na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście biernego unikania u myszy

Eksperyment przeprowadzono według metody opisanej w podrozdziale 4.2.4.

Wyselekcjonowane związki tj. JJGW07 i JJGW08 podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem (przed sesją nabywania), w dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie, a następnie w celu wywołania zaburzeń pamięci, na 15 minut przed rozpoczęciem testu myszom podawano dootrzewnowo MK-801 (0,125 mg/kg, dawka wyznaczona eksperymentalnie). Jako związku odniesienia użyto aripiprazolu, który podawano dootrzewnowo na 30 minut przed testem, w zakresie dawek 0,25-2,0 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały dootrzewnowo 0,9% roztwór NaCl (lub 1,0% Tween w przypadku aripiprazolu) i MK-801 (0,125 mg/kg) lub 0,9% roztwór NaCl w dwóch iniekcjach (0,9% NaCl i 1,0% Tween w przypadku aripiprazolu). Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.2.6 Ocena wpływu na funkcje kognitywne w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy

Test rozpoznawania nowego obiektu u myszy przeprowadzono według metody opisanej przez Bevins'a i wsp. [239]. Zwierzęta umieszczano pojedynczo w klatkach eksperymentalnych (35 cm x 35 cm x 35 cm). Pozostawały one w klatce do momentu, gdy osiągnęły łączny czas eksploracji obu identycznych obiektów (2 wieże z klocków) równy 20 sekund lub gdy upłynęło 10 minut. Myszy, które nie osiągnęły pożądanego kryterium, eliminowano z dalszej części badań. Po każdej myszy klatki oraz obiekty przecierano 70° roztworem etanolu. Po 24 h myszy ponownie umieszczono w klatkach eksperymentalnych z tą różnicą, że jeden obiekt (wieża z klocków) zamieniono na nowy (przeźroczysta butelka wypełniona piaskiem). Analogicznie jak wcześniej, myszy pozostawały w klatce do momentu osiągnięcia łącznego czasu eksploracji równego 20 sekund, ale nie dłużej niż 10 minut. W tej sesji mierzono osobno czas eksploracji każdego obiektu. Myszy, u których nie doszło do zaburzenia pamięci powinny eksplorować dłużej nowy obiekt.

Wyselekcjonowane związki tj. JJGW07 i JJGW08 podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie. Jako związku odniesienia użyto aripiprazolu, który podawano dootrzewnowo na 30 minut przed testem, w zakresie dawek 0,25-2,0 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały 0,9% roztwór NaCl lub 1,0% Tween w przypadku aripiprazolu. Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

4.2.7 Ocena wpływu na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy

Eksperyment przeprowadzono według metody opisanej w podrozdziale 4.2.6.

Wyselekcjonowane związki tj. JJGW07 i JJGW08 podawano dootrzewnowo na 30 minut przed wykonywanym eksperymentem, w dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie, a następnie w celu wywołania zaburzeń pamięci, na 15 minut przed rozpoczęciem testu myszom podawano dootrzewnowo MK-801 (0,125 mg/kg, dawka wyznaczona eksperymentalnie). Jako związku odniesienia użyto aripiprazolu,

który podawano dootrzewnowo na 30 minut przed testem, w zakresie dawek 0,25-2,0 mg/kg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały dootrzewnowo 0,9% roztwór NaCl (lub 1,0% Tween w przypadku aripiprazolu) i MK-801 (0,125 mg/kg) lub 0,9% roztwór NaCl w dwóch iniekcjach (0,9% NaCl i 1,0% Tween w przypadku aripiprazolu). Wszystkie związki podawano w stałej objętości 0,1 ml/10 g masy ciała.

5 Wyniki

5.1 Badania wstępne

Badania *in vitro*

5.1.1 Powinowactwo do receptorów dopaminergicznych D₂, serotoninerdycznych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆ i 5-HT₇ oraz adrenergicznych α₁ i α₂

Wszystkie badane związki wypierały [³H]-metylspiperon z miejsc wiązania w użytej błonie komórkowej, a ich obliczone wartości K_i wahały się w granicach 19,0-150,0 nM. Powinowactwo do receptora D₂ poniżej 50 nM wykazały związki o symbolach: JJGW02, JJGW03, JJGW08, JJGW09, JJGW11 i JJGW12. Dla związków JJGW01 i JJGW07 wartość K_i wyniosła powyżej 100 nM. Haloperidol, będący związkiem odniesienia, silnie wiązał się z receptorami dopaminergicznymi D₂, a jego obliczona wartość K_i wyniosła 1,8 nM (Tab. 5.1).

Wszystkie badane związki wypierały [³H]-8-OH-DPAT z miejsc wiązania w hipokampie szczura, a ich obliczone wartości K_i wahały się w granicach 0,6-20,0 nM. Powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} poniżej 10 nM wykazały związki o symbolach: JJGW02, JJGW03 i JJGW09. Dla związków JJGW01, JJGW07, JJGW08, JJGW11 i JJGW12 wartość K_i wyniosła poniżej lub równo 20 nM. Serotonina, będąca związkiem odniesienia, silnie wiązała się z receptorami serotoninerdycznymi 5-HT_{1A}, a jej obliczona wartość K_i wyniosła 0,7 nM (Tab. 5.1).

Wszystkie badane związki wypierały [³H]-ketanserynę z miejsc wiążących w użytej błonie komórkowej ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora 5-HT_{2A}, a ich obliczone wartości K_i wahały się w granicach 3,7-235,0 nM. Powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} poniżej 50 nM wykazały związki o symbolach: JJGW01, JJGW02 i JJGW03. Dla związków JJGW07, JJGW08, JJGW09, JJGW11 i JJGW12 wartość K_i wyniosła powyżej 100 nM. Mianseryna, będąca związkiem odniesienia, silnie wiązała się z receptorami serotoninerdycznymi 5-HT_{2A}, a jej obliczona wartość K_i wyniosła 1,0 nM (Tab. 5.1).

Tab. 5.1 Powinowactwo badanych związków do receptorów dopaminergicznych D_2 , serotoninericznych $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$, $5-HT_6$ i $5-HT_7$ oraz adrenergicznych α_1 i α_2

Związek	Ki (nM) względem typu receptora						
	D_2	$5-HT_{1A}$	$5-HT_{2A}$	$5-HT_6$	$5-HT_7$	α_1	α_2
JJGW01	150,0	20,0	3,7	b.w.	38,3	4,0±0,1	745,0±68,5
JJGW02	29,0	1,2	17,4	b.w.	12,2	4,7±0,4	638,0±48,7
JJGW03	37,0	1,0	21,5	b.w.	29,6	7,7±0,2	1756,0±108,0
JJGW07	138,5	13,6	235,0	b.w.	85,8	14,0±0,7	>5000
JJGW08	24,7	12,8	198,7	b.w.	47,8	7,9±0,5	800,0±46,7
JJGW09	28,3	0,6	114,0	b.w.	30,2	6,5±0,5	>5000
JJGW11	37,6	14,1	232,0	b.w.	21,0	8,5±1,5	>1000
JJGW12	19,0	12,6	229,0	b.w.	6,8	39,0±1,0	783,0±31,6
Haloperidol	1,8±0,2	-	-	-	-	-	-
Serotonina	-	0,7±0,02	-	-	-	-	-
Mianseryna	-	-	1,0±0,02	-	-	-	-
Metiotepina	-	-	-	3,3±0,3	1,1±0,04	-	-
Fentolamina	-	-	-	-	-	9,0±0,3	-
Klonidyna	-	-	-	-	-	-	5,0±0,2

Ki – stała hamowania obliczona według równania Cheng'a i Prusoff'a [221], b.w. brak wiązania

Żaden z badanych związków nie wykazał powinowactwa do receptorów serotoninericznych $5-HT_6$ i nie wypierał [3H]-LSD z miejsc wiązania w użytej błonie komórkowej. Metiotepina, będąca związkiem odniesienia, silnie wiązała się z receptorami serotoninericznymi $5-HT_6$, a jej obliczona wartość Ki wyniosła 3,3 nM (Tab. 5.1).

Wszystkie badane związki wypierały [3H]-LSD z miejsc wiązania w użytej błonie komórkowej, a ich obliczone wartości Ki wahały się w granicach 6,8-85,8 nM. Powinowactwo do receptora $5-HT_7$ poniżej 50 nM wykazały związki o symbolach: JJGW01, JJGW02, JJGW03, JJGW08, JJGW09, JJGW11 i JJGW12. Dla związku JJGW07 wartość Ki wyniosła 85,8 nM. Metiotepina, będąca związkiem odniesienia,

silnie wiązała się z receptorami serotonergicznymi 5-HT₇, a jej obliczona wartość K_i wyniosła 1,1 nM (Tab. 5.1).

Wszystkie badane związki wypierały także znakowaną trytem prazosynę ze specyficznych miejsc wiążących korze mózgowej szczura, a ich obliczone wartości K_i wahały się w granicach 4,0-39,0 nM. Powinowactwo do receptora α_1 poniżej 10 nM wykazały związki o symbolach: JJGW01, JJGW02, JJGW03, JJGW08, JJGW09 i JJGW11. Dla związków JJGW07 i JJGW12 wartości K_i wyniosły odpowiednio 14,0 i 39,0 nM. Fentolamina, będąca związkiem odniesienia, silnie wiązała się z receptorami adrenergicznymi α_1 , a jej obliczona wartość K_i wyniosła 9,0 nM (Tab. 5.1).

Wszystkie badane związki wypierały [³H]-klonidynę ze specyficznych miejsc wiążących korze mózgowej szczura, a ich obliczone wartości K_i wahały się w granicach 638,0-5000,0 nM. Powinowactwo do receptora α_2 poniżej 1000 nM wykazały związki o symbolach: JJGW01, JJGW02, JJGW08 i JJGW12. Klonidyna, będąca związkiem odniesienia, silnie wiązała się z receptorami adrenergicznymi α_2 , a jej obliczona wartość K_i wyniosła 5,0 nM (Tab. 5.1).

5.1.2 Aktywność wewnętrzna wobec receptorów dopaminergicznych D₂

Wyniki badań aktywności wewnętrznej wskazują, że związki: JJGW01, JJGW02 oraz JJGW03 są silnymi agonistami receptorów dopaminergicznych D₂. Ich skuteczność była do 3 razy mniejsza niż quinpirolu, a siła działania 3-20 razy słabsza w porównaniu do związku odniesienia. Pozostałe związki: JJGW07, JJGW08, JJGW09, JJGW11 i JJGW12 nie wykazały właściwości agonistycznych, natomiast działały antagonistycznie wobec badanych receptorów. Wartości ich stałej równowagi dysocjacji dla kompetycyjnego antagonisty (K_b) były około 73-13000 razy niższe niż referencyjnego antagonisty, chlorpromazyny (Tab. 5.2)

Tab. 5.2 Aktywność wewnętrzna badanych związków względem receptorów dopaminergicznych D₂

Związek	Tryb agonisty*			Tryb antagonisty**				
	E _{max} %	SEM	pEC ₅₀	E _{max} %	SEM	pIC ₅₀	K _b [nM]	R ² K _b
JJGW01	37	1,5	7,4	0	0,0	n.o.	n.o.	n.o.
JJGW02	72	0,3	8,2	0	0,0	n.o.	n.o.	n.o.
JJGW03	40	3,0	8,1	0	0,0	n.o.	n.o.	n.o.
JJGW07	20	0,5	n.o.	3	0,0	7,04	18,00	0,857
JJGW08	13	0,5	n.o.	0	0,0	7,92	2,40	0,967
JJGW09	2	0,0	n.o.	1	0,5	6,75	36,00	0,977
JJGW11	9	4,0	n.o.	0	0,0	6,92	24,00	0,940
JJGW12	4	0,5	n.o.	0	0,0	5,67	430,00	0,990
quinpirol	100	5,0	8,7	0	0,0	n.o.	n.o.	n.o.
apomorfina	100	2,0	7,5	0	0,0	n.o.	n.o.	n.o.
chlorpromazyna	2	0,5	n.o.	0	0,0	9,78	0,033	0,944

Dane wyrażono jako średnie z dwóch niezależnych eksperymentów w dwóch powtórzeniach. E_{max} – maksymalny możliwy efekt, pEC₅₀ – ujemny logarytm stężenia związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania, pIC₅₀ – ujemny logarytm stężenia związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania hamującego, K_b – równowagowa stała dysocjacji kompetycyjnego antagonisty określona za pomocą równania Chenga-Prusoffa [221], n.o. – nieoznaczalny

*Wyniki określono jako procent maksymalnej odpowiedzi agonisty (quinpirol 10⁻⁶ M)

**Wyniki określono jako procent maksymalnej odpowiedzi przy braku antagonisty

5.1.3 Aktywność wewnętrzna wobec receptorów serotonergicznyc 5-HT_{1A}

Badania aktywności wewnętrznej wskazują na słabe właściwości częściowego agonisty receptora serotonergicznego 5-HT_{1A} dla związku JJGW03. Jego skuteczność była 3 razy mniejsza w porównaniu do serotoniny, a siła działania 240 razy słabsza niż związku odniesienia. W trybie antagonisty wartości K_b dla pochodnej JJGW03 były 7-krotnie niższe niż referencyjnego antagonisty, NAN-190. Pozostałe związki wykazały natomiast silne właściwości antagonistyczne wobec receptorów serotonergicznyc 5-HT_{1A}, a wartości ich K_b okazały się 4-64 razy niższe niż referencyjnego antagonisty, NAN-190 (Tab. 5.3).

Tab. 5.3 Aktywność wewnętrzna badanych związków względem receptorów serotonergicznycych 5-HT_{1A}

Związek	Tryb agonisty*			Tryb antagonisty**				
	E _{max} %	SEM	pEC ₅₀	E _{max} %	SEM	pIC ₅₀	K _b [nM]	R ² K _b
JJGW01	17	0,5	n.o.	3	2,5	7,20	4,50	0,967
JJGW02	16	0,0	n.o.	0	0,5	8,38	0,30	0,980
JJGW03	37	1,5	5,25	1	0,0	8,17	0,49	0,941
JJGW07	1	0,5	n.o.	0	0,0	7,38	3,00	0,845
JJGW08	9	0,5	n.o.	1	0,0	8,32	0,34	0,977
JJGW09	3	2,0	n.o.	1	0,5	8,41	0,28	0,732
JJGW11	6	1,0	n.o.	1	0,0	7,40	2,90	0,988
JJGW12	2	1,0	n.o.	1	0,0	7,38	3,00	0,954
serotonina	100	3,5	7,63	0	0,0	n.o.	n.o.	n.o.
NAN-190	6	0,5	n.o.	0	0,0	8,98	0,07	0,992

Dane wyrażono jako średnie z dwóch niezależnych eksperymentów w dwóch powtórzeniach. E_{max} – maksymalny możliwy efekt, pEC₅₀ – ujemny logarytm stężenia związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania, pIC₅₀ – ujemny logarytm stężenia związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania hamującego, K_b – równowagowa stała dysocjacji kompetycyjnego antagonisty określona za pomocą równania Chenga-Prusoffa [221], n.o. – nieoznaczalny

*Wyniki określono jako procent maksymalnej odpowiedzi agonisty (serotonina 10⁻⁶ M)

**Wyniki określono jako procent maksymalnej odpowiedzi przy braku antagonisty

5.1.4 Aktywność wewnętrzna wobec receptorów serotonergicznycych 5-HT_{2A}

Badania aktywności wewnętrznej wykazały, że związki JJGW02, JJGW07, JJGW08 i JJGW09 posiadają słabe właściwości częściowych agonistów receptora serotonergicznego 5-HT_{2A}. Ich skuteczność była 4-5 razy mniejsza w porównaniu do α -metyloserotoniny, a siła działania 85-490 razy słabsza niż związku odniesienia. W trybie antagonisty wartości K_b dla tych związków były około 23-239 razy niższe niż referencyjnego antagonisty, mianseryny. Pozostałe związki JJGW01, JJGW03, JJGW11 i JJGW12 nie ujawniły właściwości agonistycznych, natomiast (poza pochodną JJGW12) wykazały bardzo słabe właściwości antagonistyczne wobec receptorów serotonergicznycych 5-HT_{2A}, a wartości ich K_b okazały się 24-361 razy niższe niż referencyjnego antagonisty, mianseryny (Tab. 5.4).

Tab. 5.4 Aktywność wewnętrzna badanych związków względem receptorów serotoninerгіcznych 5-HT_{2A}

Związek	Tryb agonisty*			Tryb antagonisty**				
	E _{max} %	SEM	pEC ₅₀	E _{max} %	SEM	pIC ₅₀	K _b [nM]	R ² K _b
JJGW01	14	2,8	n.o.	2	0,0	6,24	80	0,954
JJGW02	26	1,3	6,57	2	0,0	6,44	53	0,989
JJGW03	11	3,3	n.o.	2	0,0	6,44	54	0,951
JJGW07	28	0,5	5,81	17	8,5	5,56	550	0,915
JJGW08	21	4,0	5,86	5	2,0	5,69	290	0,931
JJGW09	28	2,3	6,06	3	0,5	6,04	120	0,935
JJGW11	4	0,8	n.o.	21	9,0	5,20	830	0,859
JJGW12	2	0,0	n.o.	23	1,0	IC ₅₀ pomiędzy -5,0 a -5,5 M		
α-metyloserotonina	100	5,3	8,50	2	0,5	n.o.	n.o.	n.o.
serotonina	112	2,5	8,36	1	1,5	n.o.	n.o.	n.o.
mianseryna	3	0,0	n.o.	3	2,0	8,07	2,3	0,914

Dane wyrażono jako średnie z dwóch niezależnych eksperymentów w dwóch powtórzeniach. E_{max} – maksymalny możliwy efekt, pEC₅₀ – ujemny logarytm stężenia związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania, pIC₅₀ – ujemny logarytm stężenia związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania hamującego, K_b – równowagowa stała dysocjacji kompetycyjnego antagonisty określona za pomocą równania Chenga-Prusoffa [221], n.o. – nieoznaczalny

*Wyniki określono jako procent maksymalnej odpowiedzi agonisty (α-metyloserotonina 10⁻⁶ M)

**Wyniki określono jako procent maksymalnej odpowiedzi przy braku antagonisty

5.1.5 Aktywność wewnętrzna wobec receptorów serotoninerгіcznych 5-HT₇

Wyniki badań aktywności wewnętrznej wskazują, że żadna z testowanych pochodnych nie wykazała właściwości agonistycznych względem receptorów serotoninerгіcznych 5-HT₇. Zaobserwowano natomiast słabe właściwości antagonistyczne dla związku JJGW01, a jego wartość K_b była 445 razy niższa niż referencyjnego antagonisty, SB-269970. Pozostałe związki wykazały bardzo słabe (JJGW02, JJGW08, JJGW09) lub nieistotne (JJGW03, JJGW07, JJGW11, JJGW12) właściwości antagonistyczne wobec badanych receptorów, a ich wartości K_b były 950-8000 razy niższe niż referencyjnego antagonisty, SB-269970 (Tab. 5.5).

Tab. 5.5 Aktywność wewnętrzna badanych związków względem receptorów serotoninerгіcznych 5-HT₇

Związek	Tryb agonisty*			Tryb antagonisty**				
	E _{max} %	SEM	pEC ₅₀	E _{max} %	SEM	pIC ₅₀	K _b [nM]	R ² K _b
JJGW01	1	0,0	n.o.	3,0	0,0	6,72	89,0	0,954
JJGW02	1	0,0	n.o.	3,0	0,0	6,32	220,0	0,940
JJGW03	1	0,0	n.o.	3,5	0,5	5,47	1600,0	0,973
JJGW07	1	0,0	n.o.	6,0	0,0	5,46	1600,0	0,990
JJGW08	1	0,0	n.o.	4,0	0,0	6,38	190,0	0,968
JJGW09	1	0,0	n.o.	7,0	3,0	6,31	230,0	0,844
JJGW11	1	0,0	n.o.	32,0	1,1	n.o.	n.o.	n.o.
JJGW12	1	0,0	n.o.	55,0	0,2	n.o.	n.o.	n.o.
serotonina	100	0,0	8,06	0,0	0,0	n.o.	n.o.	n.o.
SB-269970	0	0,0	n.o.	9,0	0,0	9,29	0,2	0,940

Dane wyrażono jako średnie z dwóch niezależnych eksperymentów w dwóch powtórzeniach. E_{max} – maksymalny możliwy efekt, pEC₅₀ – ujemny logarytm stężenia związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania, pIC₅₀ – ujemny logarytm stężenia związku, w którym zaobserwowano 50% jego maksymalnego działania hamującego, K_b – równowagowa stała dysocjacji kompetycyjnego antagonisty określona za pomocą równania Chenga-Prusoffa [221], n.o. – nieoznaczalny

*Wyniki określono jako procent maksymalnej odpowiedzi agonisty (serotonina 10⁻⁵ M)

**Wyniki określono jako procent maksymalnej odpowiedzi przy braku antagonisty

Badania *in vivo*

5.1.6 Potencjalna aktywność przeciwpsychotyczna w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 u myszy

Podanie MK-801 (0,2 mg/kg) istotnie zwiększało ruchliwość zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej w zakresie 208-349%. Efekt ten był redukowany przez podanie związków JJGW01, JJGW02 i JJGW07 w dawkach 0,625, 1,25 i 2,5 mg/kg o odpowiednio 31, 50 i 44% dla związku JJGW01 (F(5,46)=8,139, p<0,0001), 62, 64 i 64% dla JJGW02 (F(5,46)=7,825, p<0,0001) oraz 40, 51 i 50% dla JJGW07 (F(5,46)=8,424, p<0,0001) (Tab. 5.6). Podanie związku JJGW03 w dawce 2,5 mg/kg, JJGW09 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg oraz JJGW08 w zakresie dawek 0,15-2,5 mg/kg także redukowało ten efekt o odpowiednio 35% dla związku JJGW03, (F(4,39)=11,480, p<0,0001), 32 i 63% dla JJGW09 (F(4,39)=16,070, p<0,0001) oraz w granicach 24-71% dla JJGW08 (F(7,60)=7,729, p<0,0001) (Tab. 5.6).

Badane związki JJGW11 ($F(4,39)=10,310$, $p<0,0001$) i JJGW12 ($F(4,39)=5,901$, $p=0,001$) nie wpływały istotnie na zmniejszenie nadmiernej ruchliwości zwierząt (Tab. 5.6).

Olanzapina w dawkach 0,03 i 0,3 mg/kg redukowała ten efekt o odpowiednio 63 i 82% ($F(4,39)=20,240$, $p<0,0001$) (Tab. 5.6).

Tab. 5.6 Wpływ związków na odwracanie hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 u myszy

Związek	Dawka (mg/kg)	Ilość przejść ± SEM
Kontrola	-	1360,0 ± 384,2
MK-801 + 0,9% NaCl	0,2 + 0,0	4981,0 ± 541,6***
	0,2 + 0,3	3733,0 ± 530,7
MK-801 + JJGW01	0,2 + 0,625	3429,0 ± 456,9 [#]
	0,2 + 1,25	2490,0 ± 376,7 ^{###}
	0,2 + 2,5	2792,0 ± 374,8 ^{###}
Kontrola	-	1364,0 ± 384,3
MK-801 + 0,9% NaCl	0,2 + 0,0	4928,0 ± 569,1***
	0,2 + 0,3	3836,0 ± 745,9
MK-801 + JJGW02	0,2 + 0,625	1876,0 ± 419,3 ^{###}
	0,2 + 1,25	1756,0 ± 556,4 ^{###}
	0,2 + 2,5	1775,0 ± 485,6 ^{###}
Kontrola	-	1227,0 ± 355,1
MK-801 + 0,9% NaCl	0,2 + 0,0	4804,0 ± 396,3***
	0,2 + 0,625	3955,0 ± 364,2
MK-801 + JJGW03	0,2 + 1,25	3744,0 ± 460,6
	0,2 + 2,5	3123,0 ± 523,5 [#]
Kontrola	-	1208,0 ± 355,0
MK-801 + 0,9% NaCl	0,2 + 0,0	4799,0 ± 393,5***
	0,2 + 0,3	3792,0 ± 780,2
MK-801 + JJGW07	0,2 + 0,625	2875,0 ± 367,4 [#]
	0,2 + 1,25	2361,0 ± 428,1 ^{###}
	0,2 + 2,5	2382,0 ± 307,3 ^{###}
Kontrola	-	1370,0 ± 382,5
MK-801 + 0,9% NaCl	0,2 + 0,0	4928,0 ± 569,1***
	0,2 + 0,08	3755,0 ± 706,7
	0,2 + 0,15	3028,0 ± 443,1 [#]
MK-801 + JJGW08	0,2 + 0,3	2736,0 ± 579,3 ^{###}
	0,2 + 0,625	2104,0 ± 307,0 ^{###}
	0,2 + 1,25	1766,0 ± 185,6 ^{###}
	0,2 + 2,5	1435,0 ± 240,4 ^{###}
Kontrola	-	1218,0 ± 357,2
MK-801 + 0,9% NaCl	0,2 + 0,0	4775,0 ± 409,2***
	0,2 + 0,625	4364,0 ± 537,1
MK-801 + JJGW09	0,2 + 1,25	3230,0 ± 392,9 [#]
	0,2 + 2,5	1780,0 ± 247,5 ^{###}
Kontrola	-	1301,0 ± 275,7
MK-801 + 0,9% NaCl	0,2 + 0,0	4031,0 ± 600,1***
	0,2 + 0,625	2712,0 ± 365,0
MK-801 + JJGW11	0,2 + 1,25	4293,0 ± 285,9
	0,2 + 2,5	5084,0 ± 670,7
Kontrola	-	1316,0 ± 270,3
MK-801 + 0,9% NaCl	0,2 + 0,0	4056,0 ± 597,3***
	0,2 + 0,625	2897,0 ± 386,5
MK-801 + JJGW12	0,2 + 1,25	2917,0 ± 419,2
	0,2 + 2,5	2572,0 ± 335,9
Kontrola	-	1103,0 ± 197,3
MK-801 + 1,0% Tween	0,2 + 0,0	4950,0 ± 538,2***
	0,2 + 0,01	4000,0 ± 557,3
MK-801 + Olanzapina	0,2 + 0,03	1825,0 ± 433,6 ^{###}
	0,2 + 0,3	878,8 ± 145,6 ^{###}

Aktywność lokomotoryczną rejestrowano osobno dla każdej myszy w aktometrach. Po 30-minutowym okresie adaptacji mierzono liczbę przejść przez fotokomórki podczas 60-minutowej sesji. Związki badane i olanzapinę podawano dootrzewnowo (*i.p.*), 30 minut przed testem, MK-801 w dawce 0,2 mg/kg podawano 15 minut przed eksperymentem (*i.p.*). Grupa kontrolna otrzymała dwie iniekcje 0,9% roztworu NaCl (*i.p.*) lub 0,9% NaCl i 1% Tween w przypadku olanzapiny (*i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=8-10 myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Newman-Keuls *post hoc*), ***p<0,001 vs. odpowiednia grupa kontrolna, [#]p<0,05, ^{###}p<0,01, ^{####}p<0,001 vs. odpowiednia grupa z MK-801

5.1.7 Potencjalna aktywność przeciwpsychotyczna w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem amfetaminy u myszy

Podanie amfetaminy (2,5 mg/kg) istotnie zwiększało ruchliwość zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej w granicach 326-375%. Efekt ten był redukowany przez podanie związków JJGW01 i JJGW09 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg, JJGW02 w dawkach 0,625, 1,25 i 2,5 mg/kg oraz JJGW03 i JJGW07 w dawce 2,5 mg/kg o odpowiednio 39 i 48% dla związku JJGW01 ($F(4,39)=8,008$, $p<0,0001$), 39 i 78% dla JJGW09 ($F(4,39)=13,400$, $p<0,0001$), 45, 66 i 78% dla JJGW02 ($F(5,46)=13,210$, $p<0,0001$), 51% dla JJGW03 ($F(4,39)=7,129$, $p<0,001$) oraz 43% ($F(4,39)=7,458$, $p=0,001$) dla JJGW07 (Tab. 5.7). Podanie związku JJGW08 w zakresie dawek 0,3-2,5 mg/kg także redukowało ten efekt w granicach 52-82% ($F(6,54)=12,570$, $p<0,0001$) (Tab. 5.7).

Badane związki JJGW11 ($F(4,39)=6,618$, $p<0,001$) i JJGW12 ($F(4,39)=8,468$, $p<0,0001$) nie wpływały istotnie na zmniejszenie nadmiernej ruchliwości zwierząt (Tab. 5.7).

Olanzapina w dawkach 0,03 i 0,3 mg/kg redukowała ten efekt o odpowiednio 54 i 75% ($F(4,39)=9,788$, $p<0,0001$) (Tab. 5.7).

Tab. 5.7 Wpływ związków na odwracanie hiperlokomocji indukowanej podaniem amfetaminy u myszy

Związek	Dawka (mg/kg)	Ilość przejść ± SEM
Kontrola	-	968,7 ± 209,7
Amfetamina + 0,9% NaCl	2,5 + 0,0	4460,0 ± 602,1***
	2,5 + 0,625	3350,0 ± 761,4
Amfetamina + JJGW01	2,5 + 1,25	2707,0 ± 325,8 [#]
	2,5 + 2,5	2306,0 ± 289,6 [#]
Kontrola	-	983,6 ± 220,5
Amfetamina + 0,9% NaCl	2,5 + 0,0	4575,0 ± 486,4***
	2,5 + 0,3	3535,0 ± 564,9
Amfetamina + JJGW02	2,5 + 0,625	2513,0 ± 460,5 ^{###}
	2,5 + 1,25	1546,0 ± 468,7 ^{###}
	2,5 + 2,5	994,9 ± 164,2 ^{###}
Kontrola	-	993,9 ± 254,0
Amfetamina + 0,9% NaCl	2,5 + 0,0	4303,0 ± 594,7***
	2,5 + 0,625	4196,0 ± 809,8
Amfetamina + JJGW03	2,5 + 1,25	4060,0 ± 588,3
	2,5 + 2,5	2124,0 ± 602,8 [#]
Kontrola	-	983,5 ± 183,1
Amfetamina + 0,9% NaCl	2,5 + 0,0	4490,0 ± 575,3***
	2,5 + 0,625	3397,0 ± 783,9
Amfetamina + JJGW07	2,5 + 1,25	3492,0 ± 295,5
	2,5 + 2,5	2575,0 ± 535,6 [#]
Kontrola	-	984,6 ± 265,6
Amfetamina + 0,9% NaCl	2,5 + 0,0	4194,0 ± 516,4***
	2,5 + 0,15	3550,0 ± 553,7
	2,5 + 0,3	1653,0 ± 273,7 ^{###}
Amfetamina + JJGW08	2,5 + 0,625	2030,0 ± 374,7 ^{###}
	2,5 + 1,25	1414,0 ± 199,4 ^{###}
	2,5 + 2,5	752,3 ± 215,4 ^{###}
Kontrola	-	942,0 ± 224,7
Amfetamina + 0,9% NaCl	2,5 + 0,0	4239,0 ± 510,0***
	2,5 + 0,625	3760,0 ± 565,2
Amfetamina + JJGW09	2,5 + 1,25	2574,0 ± 528,8 [#]
	2,5 + 2,5	934,6 ± 172,8 ^{###}
Kontrola	-	981,8 ± 249,5
Amfetamina + 0,9% NaCl	2,5 + 0,0	4644,0 ± 660,7**
	2,5 + 0,625	5240,0 ± 1180,0
Amfetamina + JJGW11	2,5 + 1,25	6600,0 ± 1556,0
	2,5 + 2,5	7711,0 ± 1315,0
Kontrola	-	976,4 ± 245,6
Amfetamina + 0,9% NaCl	2,5 + 0,0	4635,0 ± 658,6***
	2,5 + 0,625	4133,0 ± 476,4
Amfetamina + JJGW12	2,5 + 1,25	3581,0 ± 741,4
	2,5 + 2,5	4762,0 ± 575,1
Kontrola	-	973,4 ± 250,3
Amfetamina + 1,0% Tween	2,5 + 0,0	4258,0 ± 612,8***
	2,5 + 0,01	3124,0 ± 685,9
Amfetamina + Olanzapina	2,5 + 0,03	1976,0 ± 288,7 ^{##}
	2,5 + 0,3	1066,0 ± 255,3 ^{###}

Aktywność lokomotoryczną rejestrowano osobno dla każdej myszy w aktometrach. Po 30-minutowym okresie adaptacji mierzono liczbę przejść przez fotokomórki podczas 60-minutowej sesji. Związki badane i olanzapinę podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 30 minut przed testem, amfetaminę w dawce 2,5 mg/kg podawano podskórnie (*s.c.*) 30 minut przed eksperymentem. Grupa kontrolna otrzymała dwie iniekcje 0,9% roztworu NaCl (*i.p.* i *s.c.*) lub 0,9% NaCl (*s.c.*) i 1% Tween (*i.p.*) w przypadku olanzapiny. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=8-10 myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Newman-Keuls *post hoc*) **p<0,01, ***p<0,001 vs. odpowiednia grupa kontrolna, [#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 vs. odpowiednia grupa z amfetaminą

5.1.8 Potencjalna aktywność przeciwdepresyjna w teście wymuszonego pływania u myszy

Badane związki, z wyjątkiem JJGW08, nie obniżały istotnie statystycznie czasu bezruchu zwierząt (JJGW01: (F(3,28)=2,344, p=0,094), JJGW02: (F(3,28)=1,971, p=0,141), JJGW03: (F(3,28)=0,775, p=0,518), JJGW07: (F(3,28)=3,594, p=0,026), JJGW09: (F(3,28)=2,918, p=0,052), JJGW11: (F(3,28)=0,218, p=0,883), JJGW12: (F(3,28)=3,052, p=0,045)), a także nie wpływały na czas pływania (JJGW01: (F(3,28)=1,982, p=0,140), JJGW02: (F(3,28)=2,781, p=0,060), JJGW03: (F(3,28)=3,028, p=0,046), JJGW07: (F(3,28)=2,206, p=0,110), JJGW09: (F(3,28)=3,791, p=0,021), JJGW11: (F(3,28)=0,445, p=0,723), JJGW12: (F(3,28)=0,796, p=0,507)), ani czas wspinania myszy (JJGW01: (F(3,28)=2,421, p=0,087), JJGW02: (F(3,28)=2,156, p=0,116), JJGW03: (F(3,28)=0,621, p=0,607), JJGW07: (F(3,28)=2,529, p=0,078), JJGW09: (F(3,28)=1,656, p=0,199), JJGW11: (F(3,28)=1,463, p=0,246), JJGW12: (F(3,28)=4,623, p=0,010)) (Tab. 5.8).

Związek JJGW08 natomiast w dawce 1,25 i 2,5 mg/kg istotnie wydłużał czas bezruchu myszy odpowiednio o 19 i 22% (F(5,42)=6,073, p<0,001) oraz skracał czas pływania zwierząt odpowiednio o 79 i 96% w porównaniu do grupy kontrolnej (F(5,42)=5,705, p<0,001), nie wpływając przy tym na czas wspinania (F(5,42)=3,174, p=0,016) (Tab. 5.8). Zweryfikowano dodatkowo, czy badany związek wpływał niekorzystnie na mierzone parametry w pozostałych dawkach aktywnych przeciwpyschotycznie, jednak w dawkach 0,15, 0,3 i 0,625 mg/kg JJGW08 nie wywierał wpływu na czas bezruchu, czas pływania, ani czas wspinania myszy (Tab. 5.8).

Mianseryna w dawce 10 mg/kg istotnie skracała czas bezruchu zwierząt o 28% (F(2,27)=6,521, p<0,01) i wydłużała czas wspinania myszy w stosunku do grupy kontrolnej o 147% (F(2,27)=6,555, p<0,01), nie wpływając przy tym na czas pływania (F(2,27)=0,739, p=0,487) (Tab. 5.8).

Tab. 5.8 Wpływ związków na czas bezruchu oraz czas pływania i wspinania w teście wymuszonego pływania u myszy

Związek	Dawka (mg/kg)	Czas bezruchu ± SEM (s)	Czas pływania ± SEM (s)	Czas wspinania ± SEM (s)
Kontrola	-	182,9 ± 12,4	42,8 ± 9,2	6,2 ± 1,9
JJGW01	0,625	214,1 ± 6,9	26,4 ± 5,4	2,4 ± 1,4
	1,25	189,4 ± 7,0	46,2 ± 6,2	2,4 ± 1,1
	2,5	189,8 ± 8,5	50,2 ± 8,3	1,6 ± 0,7
Kontrola	-	212,3 ± 4,3	36,0 ± 5,1	6,3 ± 1,9
JJGW02	0,625	230,1 ± 4,2	18,3 ± 5,6	2,4 ± 1,6
	1,25	226,0 ± 4,3	19,6 ± 3,9	4,0 ± 3,1
	2,5	223,0 ± 7,9	17,5 ± 6,3	13,2 ± 5,1
Kontrola	-	192,7 ± 17,3	33,0 ± 4,3	6,3 ± 1,9
JJGW03	0,625	214,5 ± 8,7	14,5 ± 6,6	11,0 ± 6,8
	1,25	189,6 ± 11,0	42,8 ± 6,0	12,4 ± 4,3
	2,5	195,0 ± 12,6	28,5 ± 9,2	15,1 ± 4,3
Kontrola	-	189,3 ± 14,7	45,0 ± 15,5	6,1 ± 1,9
JJGW07	0,625	211,6 ± 7,8	25,2 ± 7,5	3,2 ± 1,2
	1,25	208,1 ± 6,6	12,8 ± 2,8	19,1 ± 6,8
	2,5	159,4 ± 17,7	48,3 ± 14,4	19,0 ± 7,8
Kontrola	-	193,5 ± 6,6	40,3 ± 7,0	6,3 ± 1,9
	0,15	204,0 ± 10,7	34,3 ± 10,4	1,7 ± 1,0
	0,3	204,1 ± 7,7	26,5 ± 7,3	9,4 ± 3,0
JJGW08	0,625	216,6 ± 5,8	18,1 ± 4,5	3,0 ± 1,6
	1,25	230,4 ± 2,9**	8,5 ± 2,7**	1,2 ± 0,5
	2,5	235,3 ± 2,4***	1,4 ± 0,6***	3,3 ± 1,6
Kontrola	-	190,8 ± 15,2	33,6 ± 6,5	6,2 ± 1,9
JJGW09	0,625	217,8 ± 8,6	19,7 ± 8,6	2,5 ± 1,7
	1,25	193,0 ± 18,6	22,0 ± 6,2	25,0 ± 19,0
	2,5	136,7 ± 30,8	83,6 ± 28,0	36,1 ± 15,5
Kontrola	-	191,3 ± 11,3	39,1 ± 9,3	26,6 ± 7,9
JJGW11	0,625	191,2 ± 14,6	29,4 ± 6,8	19,5 ± 12,4
	1,25	201,4 ± 5,9	36,1 ± 5,9	2,5 ± 1,1
	2,5	191,1 ± 10,2	29,9 ± 6,0	19,0 ± 8,2
Kontrola	-	186,2 ± 13,7	38,4 ± 9,0	26,3 ± 7,9
JJGW12	0,625	208,1 ± 6,2	24,5 ± 4,4	7,5 ± 2,6
	1,25	159,5 ± 11,3	35,7 ± 7,1	44,9 ± 7,2
	2,5	188,5 ± 13,1	29,6 ± 6,6	21,9 ± 9,2
Kontrola	-	178,0 ± 6,0	31,2 ± 4,9	30,8 ± 6,0
Mianseryna	5,0	157,4 ± 9,8	28,8 ± 3,7	53,8 ± 9,1
	10,0	127,8 ± 12,7**	36,1 ± 4,3	76,1 ± 10,7**

W teście wymuszonego pływania dla myszy umieszczonych w zbiornikach z wodą mierzono czas bezruchu oraz czas pływania i wspinania, przez 4 minuty (po 2-minutowym okresie adaptacyjnym). Związki badane i mianserynę podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 30 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=8-10 myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Dunnett *post hoc*) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. odpowiednia grupa kontrolna

5.1.9 Potencjalna aktywność przeciwdepresyjna w teście zawieszania za ogon u myszy

Związki JJGW01, JJGW03, JJGW07 i JJGW09 w dawkach 0,15, 0,3 i 0,625 mg/kg istotnie statystycznie obniżały czas bezruchu zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej o odpowiednio 47, 38 i 39% dla związku JJGW01 ($F(6,63)=8,618$, $p<0,0001$), 48, 42 i 44% dla związku JJGW03 ($F(6,63)=7,238$, $p<0,0001$), 50, 41 i 39% dla związku JJGW07 ($F(6,63)=7,178$, $p<0,0001$) oraz 45, 40 i 42% dla związku JJGW09 ($F(6,63)=15,640$, $p<0,0001$) (Tab. 5.9).

JJGW08 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg oraz JJGW09 w dawce 2,5 mg/kg istotnie statystycznie zwiększały czas bezruchu zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej o odpowiednio 64 i 87% ($F(5,54)=19,960$ $p<0,0001$) dla związku JJGW08 oraz 69% ($F(6,63)=15,640$, $p<0,0001$) dla pochodnej JJGW09 (Tab. 5.9). Zweryfikowano dodatkowo, czy związek JJGW08 wpływał niekorzystnie na mierzony parametr w pozostałych dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie, jednak w dawkach 0,15, 0,3 i 0,625 mg/kg nie wywierał on wpływu na czas bezruchu myszy (Tab. 5.9).

Związki JJGW02 ($F(3,36)=3,730$, $p=0,020$), JJGW11 ($F(3,36)=0,813$, $p=0,495$) i JJGW12 ($F(3,36)=1,543$, $p=0,220$) nie wpływały istotnie na czas bezruchu zwierząt w przeprowadzonym teście (Tab. 5.9).

Moklobemid w dawce 20 mg/kg istotnie statystycznie redukował czas bezruchu myszy w porównaniu do grupy kontrolnej o 63% ($F(2,27)=14,740$, $p<0,0001$) (Tab. 5.9).

Tab. 5.9 Wpływ związków na czas bezruchu w teście zawieszania za ogon u myszy

Związek	Dawka (mg/kg)	Czas bezruchu ± SEM (s)
Kontrola	-	115,8 ± 11,8
	0,08	82,8 ± 4,9
	0,15	61,6 ± 8,0**
	0,3	72,2 ± 5,9*
	0,625	71,1 ± 9,3*
	1,25	94,0 ± 6,5
JJGW01	2,5	142,9 ± 16,9
	-	115,3 ± 11,6
	0,625	100,9 ± 9,5
	1,25	143,4 ± 16,5
	2,5	170,7 ± 23,0
	Kontrola	-
JJGW02	0,08	94,9 ± 13,0
	0,15	59,8 ± 14,7*
	0,3	66,0 ± 7,8*
	0,625	63,6 ± 14,6*
	1,25	117,2 ± 16,2
	2,5	150,0 ± 7,7
Kontrola	-	117,7 ± 13,3
	0,08	77,0 ± 12,3
	0,15	58,3 ± 11,8*
	0,3	69,1 ± 7,5*
	0,625	72,1 ± 15,8*
	1,25	111,8 ± 9,4
JJGW07	2,5	147,2 ± 13,1
	-	117,0 ± 8,0
	0,15	84,2 ± 11,8
	0,3	84,6 ± 17,0
	0,625	104,9 ± 18,8
	1,25	192,2 ± 8,0***
JJGW08	2,5	218,9 ± 9,6***
	-	117,5 ± 11,3
	0,08	109,4 ± 11,4
	0,15	64,8 ± 9,8*
	0,3	70,8 ± 12,4*
	0,625	68,2 ± 12,4*
JJGW09	1,25	91,1 ± 12,9
	2,5	198,2 ± 12,4***
	-	116,5 ± 16,5
	0,625	83,4 ± 15,5
	1,25	92,6 ± 15,4
	2,5	93,2 ± 15,1
JJGW10	-	116,6 ± 16,5
	0,625	72,9 ± 14,3
	1,25	80,5 ± 20,3
	2,5	83,8 ± 9,0
JJGW11	-	116,0 ± 7,9
	10,0	88,9 ± 8,9
	20,0	42,7 ± 11,8***
JJGW12	-	116,0 ± 7,9
	10,0	88,9 ± 8,9
	20,0	42,7 ± 11,8***
Moklobemid	-	116,0 ± 7,9
	10,0	88,9 ± 8,9
	20,0	42,7 ± 11,8***

W teście myszy zawieszano za ogon (70 cm nad podłożem) przy pomocy taśmy samoprzylepnej (1cm szerokości) i mierzono czas bezruchu zwierząt przez 6 minut trwania eksperymentu. Związki badane i moklobemid podawano dootrzewnowo (*i.p.*) odpowiednio 30 lub 60 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=10 myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Newman-Keuls *post hoc*) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. odpowiednia grupa kontrolna

5.1.10 Potencjalna aktywność przeciwlękowa w teście czterech płytek u myszy

Związek JJGW01 w dawce 0,625 mg/kg istotnie statystycznie zwiększał liczbę karanych przejść zwierząt o 76% w porównaniu z grupą kontrolną ($F(4,35)=4,608$, $p<0,01$) (Tab. 5.10).

Związek JJGW07 ($F(3,28)=4,859$, $p<0,01$) i JJGW09 ($F(3,28)=2,998$, $p<0,01$) w dawce 1,25 mg/kg istotnie statystycznie zwiększały liczbę karanych przejść w porównaniu z grupą kontrolną o odpowiednio 36 i 53% (Tab. 5.10).

JJGW08 w dawkach 0,3 i 0,625 mg/kg wykazywał wzrost mierzonego parametru kolejno o 54 i 49% w porównaniu do grupy kontrolnej ($F(5,42)=9,103$, $p<0,0001$) (Tab. 5.10).

Związki JJGW02 ($F(3,28)=2,082$, $p=0,125$), JJGW03 ($F(3,28)=1,150$, $p=0,346$), JJGW11 ($F(3,28)=1,809$, $p=0,168$) i JJGW12 ($F(3,28)=1,587$, $p=0,215$) nie wpływały na liczbę karanych przejść zwierząt (Tab. 5.10).

Diazepam istotnie statystycznie zwiększał ilość przejść myszy, karanych impulsem elektrycznym w zakresie dawek 1,25-5 mg/kg, w granicach 59-73% w porównaniu do grupy kontrolnej ($F(5,54)=5,647$, $p<0,001$) (Tab. 5.10).

Tab. 5.10 Wpływ związków na liczbę przejść karanych impulsem elektrycznym w teście czterech płytek u myszy

Związek	Dawka (mg/kg)	Ilość przejść ± SEM
Kontrola	-	3,4 ± 0,3
	0,3	4,6 ± 0,5
JJGW01	0,625	6,0 ± 0,4**
	1,25	4,0 ± 0,6
	2,5	4,6 ± 0,4
Kontrola	-	3,4 ± 0,5
	0,625	5,3 ± 0,3
	1,25	4,9 ± 0,9
JJGW02	2,5	3,8 ± 0,6
	-	3,6 ± 0,4
	0,625	4,5 ± 0,5
JJGW03	1,25	4,5 ± 0,4
	2,5	3,8 ± 0,5
	Kontrola	-
0,625		4,5 ± 0,3
1,25		5,3 ± 0,3*
JJGW07	2,5	3,6 ± 0,3
	-	3,9 ± 0,6
	0,15	4,0 ± 0,5
JJGW08	0,3	6,0 ± 0,4**
	0,625	5,8 ± 0,4**
	1,25	3,8 ± 0,4
	2,5	2,6 ± 0,3
	Kontrola	-
0,625		4,5 ± 0,5
1,25		5,8 ± 0,4*
JJGW09	2,5	4,6 ± 0,6
	-	3,8 ± 0,5
	0,625	4,9 ± 0,5
JJGW11	1,25	3,0 ± 0,7
	2,5	4,3 ± 0,7
	Kontrola	-
0,625		5,4 ± 0,8
1,25		5,6 ± 0,7
JJGW12	2,5	5,6 ± 0,6
	-	3,7 ± 0,4
	0,625	4,4 ± 0,3
Diazepam	1,25	6,0 ± 0,4*
	2,5	6,4 ± 0,2**
	5,0	5,9 ± 0,8*
	10,0	3,5 ± 0,7

Myszy umieszczano w aparacie i po 15-sekundowym okresie adaptacji każde przejście myszy na inną płytkę było karane nieuszkodzającym bodźcem elektrycznym. Liczbę karanych przejść mierzono przez okres 60 sekund. Związki badane i diazepam podawano dootrzewnowo (*i.p.*) odpowiednio 30 lub 60 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=8 myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Newman-Keuls *post hoc*) *p<0,05, **p<0,01 vs. odpowiednia grupa kontrolna

5.1.11 Potencjalna aktywność przeciwlękowa w teście uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy

Żaden z badanych związków w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg nie wydłużał istotnie statystycznie czasu spędzonego w ramionach otwartych przez myszy (JJGW01: (F(3,28)=3,255, p=0,036), JJGW02: (F(3,28)=0,897, p=0,455), JJGW03: (F(3,28)=0,135, p=0,938), JJGW07: (F(3,28)=3,314, p=0,034), JJGW08: (F(3,28)=0,830, p=0,488), JJGW09: (F(3,28)=0,997, p=0,409), JJGW11 F(3,28)=0,171, p=0,915), JJGW12: F(3,28)=2,355, p=0,093)) (Tab. 5.11).

Związki JJGW01 (F(3,28)=4,822, p=0,008), JJGW03 (F(3,28)=0,206, p=0,891), JJGW11 (F(3,28)=0,622, p=0,607) i JJGW12 F(3,28)=0,875, p=0,466) nie wpływały istotnie na liczbę wejść do ramion otwartych labiryntu (Tab. 5.11). Natomiast związek JJGW02 w dawce 2,5 mg/kg, a także związki JJGW07 i JJGW08 w dawkach 0,625, 1,25 i 2,5 mg/kg oraz JJGW09 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg zmniejszały liczbę wejść do ramion otwartych labiryntu w stosunku do grupy kontrolnej o odpowiednio 79% dla związku JJGW02 (F(3,28)=6,024, p<0,01), 54, 43 i 49% dla JJGW07 (F(3,28)=4,036, p<0,05), 59, 46 i 34% dla JJGW08 (F(3,28)=6,893, p<0,01) oraz 48 i 65% dla JJGW09 (F(3,28)=6,541, p<0,01) (Tab. 5.11).

Diazepam w dawce 1,25 i 2,5 mg/kg istotnie statystycznie wydłużał czas spędzony w ramionach otwartych przez myszy o odpowiednio 84 i 60% w porównaniu do grupy kontrolnej (F(4,35)=12,870, p<0,0001). Równocześnie w dawkach 0,625, 1,25 i 2,5 mg/kg istotnie zwiększał liczbę wejść do ramion otwartych labiryntu w stosunku do grupy kontrolnej odpowiednio o 79, 74 oraz 126% (F(4,35)=5,908, p<0,001) (Tab. 5.11).

Tab. 5.11 Wpływ związków na czas spędzony w ramionach otwartych oraz na liczbę wejść do ramion otwartych labiryntu w teście uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy

Związek	Dawka (mg/kg)	Czas w ramionach otwartych ± SEM (s)	Liczba wejść do ramion otwartych ± SEM
Kontrola	-	56,7 ± 10,3	9,8 ± 1,6
	0,625	25,7 ± 6,2	3,6 ± 0,9
JJGW01	1,25	50,1 ± 12,5	15,3 ± 4,2
	2,5	25,3 ± 5,1	5,1 ± 1,4
Kontrola	-	57,4 ± 10,2	9,5 ± 1,5
	0,625	40,7 ± 7,5	6,1 ± 1,3
JJGW02	1,25	35,6 ± 6,3	5,9 ± 1,4
	2,5	39,9 ± 14,4	2,0 ± 0,6**
Kontrola	-	55,7 ± 10,7	9,6 ± 1,5
	0,625	62,3 ± 15,1	8,6 ± 1,6
JJGW03	1,25	64,3 ± 10,5	10,0 ± 2,5
	2,5	65,4 ± 10,3	8,3 ± 1,5
Kontrola	-	56,2 ± 6,4	9,8 ± 1,2
	0,625	46,8 ± 10,7	4,5 ± 0,9*
JJGW07	1,25	64,5 ± 13,6	5,6 ± 1,6*
	2,5	24,2 ± 5,0	5,0 ± 1,0*
Kontrola	-	58,2 ± 6,6	9,9 ± 1,1
	0,625	41,3 ± 7,2	4,1 ± 0,6**
JJGW08	1,25	42,7 ± 10,2	5,3 ± 1,1**
	2,5	51,1 ± 10,1	6,5 ± 0,9*
Kontrola	-	56,6 ± 7,3	9,6 ± 1,2
	0,625	45,0 ± 9,3	6,9 ± 1,4
JJGW09	1,25	62,6 ± 14,5	5,0 ± 0,8*
	2,5	40,7 ± 7,9	3,4 ± 0,7**
Kontrola	-	68,1 ± 12,6	10,9 ± 1,9
	0,625	74,8 ± 7,5	8,9 ± 0,8
JJGW11	1,25	68,7 ± 11,6	8,3 ± 1,5
	2,5	64,2 ± 9,7	9,0 ± 1,3
Kontrola	-	67,1 ± 13,0	10,0 ± 2,0
	0,625	85,1 ± 12,1	10,9 ± 1,6
JJGW12	1,25	73,5 ± 11,1	9,8 ± 1,6
	2,5	42,2 ± 10,9	7,3 ± 1,4
Kontrola	-	81,6 ± 8,6	8,1 ± 0,8
	0,3	64,3 ± 12,4	9,8 ± 1,6
Diazepam	0,625	75,0 ± 11,7	14,5 ± 1,6*
	1,25	150,2 ± 5,2***	14,1 ± 1,9*
	2,5	130,5 ± 12,7 **	18,3 ± 2,1**

Myszy umieszczano pojedynczo w centralnym polu labiryntu i obserwowano przez 5 minut. Mierzono liczbę wejść zwierzęcia do ramion otwartych i zamkniętych, a także czas spędzony w ramionach otwartych i zamkniętych labiryntu. Związki badane i diazepam podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 30 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=8 myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Newman-Keuls *post hoc*) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. odpowiednia grupa kontrolna

5.1.12 Wpływ badanych związków na ruchliwość spontaniczną u myszy

Badane związki poddano ocenie wpływu na ruchliwość spontaniczną myszy dla każdego z przeprowadzonych powyżej testów behawioralnych.

Żaden z testowanych związków nie wpływał na aktywność lokomotoryczną zwierząt w 60-minutowej sesji, odpowiadającej testom hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 oraz amfetaminą (JJGW01: (F(3,29)=3,613, p=0,025), JJGW02: (F(3,29)=4,103, p=0,015), JJGW03: (F(3,28)=0,483, p=0,697), JJGW07: (F(3,28)=2,269, p=0,102), JJGW08: (F(5,43)=0,560, p=0,730), JJGW09: (F(3,29)=1,276, p=0,301), JJGW11: (F(3,29)=1,047, p=0,387), JJGW12: (F(3,29)=1,345, p=0,279)) (Tab. 5.12).

Testowane związki nie wywoływały zmian w aktywności lokomotorycznej zwierząt w 4-minutowej sesji odpowiadającej testowi wymuszonego pływania (JJGW01: (F(3,30)=2,282, p=0,099), JJGW03: (F(3,30)=1,310, p=0,289), JJGW07: (F(3,32)=0,626, p=0,603), JJGW09: (F(3,30)=1,164, p=0,340), JJGW11: (F(3,36)=2,270, p=0,097), JJGW12: (F(3,30)=0,451, p=0,718)) (Tab. 5.12). Jedynie związek JJGW02 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg oraz JJGW08 w dawce 2,5 mg/kg istotnie statystycznie zmniejszały ruchliwość spontaniczną zwierząt odpowiednio o 65 i 69% (F(3,30)=8,476, p<0,001,) dla pochodnej JJGW02 oraz 64% (F(3,30)=5,509, p<0,01) dla związku JJGW08 (Tab. 5.12).

Badane pochodne nie wpływały na ruchliwość spontaniczną zwierząt podczas 6-minutowej sesji odpowiadającej testowi zawieszania za ogon (JJGW01: (F(6,51)=3,745, p=0,004), JJGW03: (F(6,51)=1,214, p=0,315), JJGW07: (F(6,51)=2,218, p=0,056), JJGW09: (F(6,51)=2,911, p=0,016), JJGW11: (F(3,36)=2,335, p=0,090), JJGW12: (F(3,30)=0,475, p=0,702)) (Tab. 5.12). Wyłącznie związek JJGW02 w dawkach 0,625, 1,25 i 2,5 mg/kg oraz JJGW08 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg istotnie statystycznie obniżały aktywność lokomotoryczną zwierząt odpowiednio o 30, 63 i 66% (F(3,30)=9,150, p<0,001) dla związku JJGW02 oraz 45 i 62% (F(3,30)=4,847, p<0,01) dla pochodnej JJGW08 (Tab. 5.12).

Testowane związki nie wywoływały zmian w ruchliwości spontanicznej zwierząt podczas 1-minutowej sesji odpowiadającej testowi czterech płytek (JJGW01: (F(4,37)=3,212, p=0,023), JJGW03: (F(3,30)=0,257, p=0,856), JJGW07: (F(3,31)=0,408, p=0,748), JJGW08: (F(5,44)=3,446, p=0,010), JJGW09: (F(3,30)=1,457, p=0,246), JJGW11: (F(3,30)=1,105, p=0,362), JJGW12:

($F(3,30)=1,558$, $p=0,220$) (Tab. 5.12). Jedynie związek JJGW02 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg istotnie statystycznie zmniejszał aktywność lokomotoryczną zwierząt odpowiednio o 38 i 57% ($F(3,30)=5,775$, $p<0,01$) (Tab. 5.12).

Badane pochodne nie wpływały na ruchliwość spontaniczną zwierząt podczas 5-minutowej sesji odpowiadającej testowi uniesionego labiryntu krzyżowego (JJGW01: ($F(3,30)=2,065$, $p=0,126$), JJGW03: ($F(3,30)=0,510$, $p=0,679$), JJGW07: ($F(3,32)=0,144$, $p=0,933$), JJGW08: ($F(3,30)=2,677$, $p=0,065$), JJGW09: ($F(3,30)=1,917$, $p=0,148$), JJGW11: ($F(3,36)=2,481$, $p=0,077$), JJGW12: ($F(3,30)=0,257$, $p=0,856$)) (Tab. 5.12). Tylko związek JJGW02 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg istotnie statystycznie obniżał aktywność lokomotoryczną zwierząt odpowiednio o 56 i 70% ($F(3,30)=7,995$, $p<0,001$) (Tab.5.12).

Tab. 5.12 Wpływ związków na ruchliwość spontaniczną myszy

Związek	Dawka (mg/kg)	Ilość przejść ± SEM w ciągu 60 minut	Ilość przejść ± SEM w ciągu 4 minut	Ilość przejść ± SEM w ciągu 6 minut	Ilość przejść ± SEM w ciągu 1 minuty	Ilość przejść ± SEM w ciągu 5 minut	
Kontrola	-	1105,0 ± 189,6	214,0 ± 34,2	345,9 ± 49,2	51,9 ± 6,5	269,6 ± 45,4	
	0,15	-	-	272,4 ± 36,2	-	-	
	JJGW01	0,3	-	-	316,8 ± 23,9	55,5 ± 6,7	-
		0,625	1862,0 ± 264,7	117,9 ± 24,1	195,6 ± 23,7	29,9 ± 4,7	147,5 ± 27,8
		1,25	1820,0 ± 244,2	132,3 ± 24,3	208,4 ± 37,6	36,1 ± 6,9	177,0 ± 35,0
		2,5	1081,0 ± 211,1	138,9 ± 32,0	219,8 ± 42,1	38,3 ± 4,8	186,5 ± 35,7
Kontrola	-	1120,0 ± 195,4	212,2 ± 34,0	334,3 ± 51,0	52,2 ± 6,6	275,5 ± 44,7	
	0,625	1543,0 ± 203,2	161,4 ± 10,0	232,5 ± 15,8*	39,0 ± 3,9	197,8 ± 12,4	
	JJGW02	1,25	1036,0 ± 219,4	75,0 ± 16,3**	125,0 ± 26,1***	32,3 ± 4,7*	120,1 ± 21,0**
		2,5	612,3 ± 92,9	64,9 ± 24,1***	113,0 ± 24,2***	22,3 ± 5,0**	82,1 ± 25,0***
Kontrola	-	2078,0 ± 449,1	198,5 ± 21,1	293,2 ± 32,7	40,9 ± 7,2	247,3 ± 29,7	
	0,15	-	-	269,8 ± 51,5	-	-	
	JJGW03	0,3	-	-	231,1 ± 26,9	-	-
		0,625	1837,0 ± 246,1	217,1 ± 21,8	305,8 ± 27,4	38,5 ± 6,6	256,9 ± 21,4
		1,25	2366,0 ± 390,0	164,3 ± 17,2	255,1 ± 20,0	42,3 ± 3,4	215,3 ± 17,3
		2,5	1796,0 ± 396,4	179,1 ± 16,3	243,6 ± 36,4	35,0 ± 5,9	234,3 ± 24,6
Kontrola	-	2112,0 ± 408,9	183,6 ± 25,5	274,1 ± 33,4	38,4 ± 7,6	198,1 ± 32,1	
	0,15	-	-	324,9 ± 29,6	-	-	
	JJGW07	0,3	-	-	304,5 ± 23,6	-	-
		0,625	2247,0 ± 128,1	161,4 ± 18,0	237,1 ± 17,2	32,3 ± 3,9	192,6 ± 12,4
		1,25	2029,0 ± 276,2	141,3 ± 27,7	232,0 ± 26,5	34,9 ± 6,9	203,4 ± 25,7
		2,5	3035,0 ± 340,1	179,1 ± 22,7	270,0 ± 17,6	42,1 ± 6,7	214,1 ± 19,5

Aktywność lokomotoryczną rejestrowano osobno dla każdej myszy w aktometrach. Po 30-minutowym okresie adaptacji mierzono liczbę przejść przez fotokomórki w odpowiednich przedziałach czasowych tj.: 60 minut dla testów hiperlokomocji, 4 minuty dla testu wymuszonego pływania, 6 minut dla testu zawieszania za ogon, 1 minuta dla testu czterech płytek i 5 minut dla testu uniesionego labiryntu krzyżowego. Związki badane podawano dootrzewnowo (*i.p.*), 30 minut przed testem. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=8-10 myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Newman-Keuls *post hoc*) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. odpowiednia grupa kontrolna

Tab. 5.12 Wpływ związków na ruchliwość spontaniczną myszy cd.

Związek	Dawka (mg/kg)	Ilość przejść ± SEM w ciągu 60 minut	Ilość przejść ± SEM w ciągu 4 minut	Ilość przejść ± SEM w ciągu 6 minut	Ilość przejść ± SEM w ciągu 1 minuty	Ilość przejść ± SEM w ciągu 5 minut
Kontrola	-	1140,0 ± 199,8	195,5 ± 21,5	281,8 ± 28,8	44,9 ± 6,6	218,7 ± 34,6
	0,15	1346,0 ± 313,2	-	-	37,5 ± 5,4	-
	0,3	1588,0 ± 273,0	-	-	46,4 ± 7,4	-
	0,625	1671,0 ± 326,3	130,8 ± 18,8	191,4 ± 28,6	26,6 ± 4,9	165,0 ± 25,2
JJGW08	1,25	1769,0 ± 295,2	121,4 ± 17,8	154,8 ± 31,7*	21,8 ± 4,8	124,3 ± 26,6
	2,5	1450,0 ± 442,8	69,9 ± 30,4**	107,8 ± 48,0**	18,6 ± 8,5	101,6 ± 38,9
	Kontrola	-	1435,0 ± 378,9	169,3 ± 23,4	297,1 ± 27,0	45,8 ± 5,7
JJGW09	0,15	-	-	281,5 ± 45,2	-	-
	0,3	-	-	321,5 ± 43,2	-	-
	0,625	2542,0 ± 445,9	136,5 ± 24,6	193,8 ± 33,4	37,1 ± 4,9	182,0 ± 17,2
	1,25	2202,0 ± 540,3	112,3 ± 22,5	176,1 ± 30,4	35,9 ± 4,4	145,9 ± 26,7
	2,5	1822,0 ± 329,6	126,0 ± 22,6	195,5 ± 26,6	30,6 ± 6,1	166,8 ± 25,0
Kontrola	-	1779,0 ± 447,7	192,5 ± 23,2	317,9 ± 25,5	47,3 ± 7,3	256,1 ± 25,4
	0,625	2474,0 ± 286,1	178,4 ± 15,6	272,8 ± 26,3	47,3 ± 9,7	206,0 ± 22,8
	1,25	2385,0 ± 228,4	169,9 ± 11,0	271,6 ± 14,2	56,9 ± 3,5	231,3 ± 10,7
JJGW11	2,5	1861,0 ± 355,9	111,8 ± 26,6	220,9 ± 33,0	37,6 ± 7,0	160,4 ± 32,6
	Kontrola	-	1087,0 ± 193,2	175,6 ± 22,7	303,7 ± 27,0	44,5 ± 5,7
JJGW12	0,625	2075,0 ± 570,7	164,5 ± 37,4	234,3 ± 53,0	40,4 ± 9,0	198,6 ± 44,8
	1,25	1672,0 ± 245,1	177,6 ± 38,4	277,3 ± 60,6	59,0 ± 9,0	231,4 ± 48,5
	2,5	1131,0 ± 520,4	215,1 ± 31,0	310,8 ± 59,3	62,0 ± 10,4	253,4 ± 50,0

Aktywność lokomotoryczną rejestrowano osobno dla każdej myszy w aktometrach. Po 30-minutowym okresie adaptacji mierzono liczbę przejść przez fotokomórki w odpowiednich przedziałach czasowych tj.: 60 minut dla testów hiperlokomocji, 4 minuty dla testu wymuszonego pływania, 6 minut dla testu zawieszania za ogon, 1 minuta dla testu czterech płytek i 5 minut dla testu uniesionego labiryntu krzyżowego. Związki badane podawano dootrzewnowo (*i.p.*), 30 minut przed testem. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=8-10 myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Newman-Keuls *post hoc*) **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001 vs. odpowiednia grupa kontrolna

5.1.13 Wpływ badanych związków na zdolność indukowania katalepsji u myszy

Dla związków aktywnych w teście hiperlokomocji wywołanej MK-801/amfetaminą wyznaczono najniższe dawki indukujące katalepsję u myszy (Tab. 5.13). Dawki kataleptogenne dla związków JJGW01 i JJGW09 wyniosły 20 mg/kg, natomiast dla pozostałych związków oraz dla olanzapiny dawka ta wyniosła 10 mg/kg.

Tab. 5.13 Wpływ związków na indukowanie katalepsji u myszy

Związek	Najniższa dawka kataleptogenna (mg/kg)
JJGW01	20,0
JJGW02	10,0
JJGW03	10,0
JJGW07	10,0
JJGW08	10,0
JJGW09	20,0
Olanzapina	10,0

W teście mierzono czas utrzymywania przez zwierzę obu przednich łap na metalowym cylindrycznym pręcie usytuowanym 4 cm nad powierzchnią blatu, po 30, 60 i 120 minutach od podania związków dootrzewnowo (*i.p.*) (3 próby, maksymalnie po 60 sekund). Wynik dla każdej próby oceniano w następujący sposób: 0 punktów jeśli zwierzę utrzymywało wymuszoną pozycję <15 sekund, 1 punkt za utrzymywanie się na pręcie przez 15-29,9 sekund, 2 punkty za utrzymywanie się przez 30-59,9 sekund oraz 3 punkty za pozostawanie na pręcie ≥ 60 sekund. Minimalną dawką kataleptogenną określono najniższą dawkę indukującą średni wynik katalepsji >1 w 30, 60 i/lub 120 minucie po podaniu związków. n=10 myszy na grupę

5.1.14 Wpływ badanych związków na koordynację ruchową myszy w teście rotarod

Żaden z badanych związków w teście rotarod nie upośledzał koordynacji ruchowej zwierząt w dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie (Tab. 5.14).

Wartości ED₅₀ dla wszystkich badanych związków przedstawiono w Tabeli 5.14.

Tab. 5.14 Wpływ związków na koordynację ruchową myszy w teście rotarod

Związek	Dawka (mg/kg)	Średni czas utrzymywania się na pręcie \pm SEM (s)	% zwierząt, które nie utrzymały się na pręcie w czasie 60 s	ED ₅₀ (mg/kg)
JJGW01	40	56,3 \pm 3,8	12,5	89,0 (58,9 do 134,3)
	80	49,6 \pm 5,3	50,0	
	120	47,3 \pm 6,9	62,5	
JJGW02	40	52,9 \pm 4,8	25,0	82,8 (44,5 do 154,0)
	80	41,0 \pm 9,5	50,0	
	120	40,5 \pm 7,8	62,5	
JJGW03	10	59,6 \pm 0,4	12,5	18,7 (13,5 do 26,1)
	20	44,3 \pm 6,0	62,5	
	30	39,6 \pm 7,1	75,0	
JJGW07	20	58,3 \pm 1,1	25,0	28,3 (22,6 do 35,4)
	30	50,3 \pm 6,2	37,5	
	40	20,0 \pm 8,4	87,5	
JJGW08	10	57,9 \pm 1,5	25,0	18,2 (11,3 do 29,1)
	20	40,9 \pm 8,5	50,0	
	30	19,6 \pm 8,9	75,0	
JJGW09	10	39,8 \pm 9,9	37,5	17,5 (8,8 do 35,1)
	30	42,9 \pm 8,3	50,0	
	50	19,6 \pm 6,1	87,5	
JJGW11	40	59,9 \pm 0,1	12,5	89,0 (58,9 do 134,3)
	80	46,8 \pm 6,0	50,0	
	120	42,4 \pm 7,4	62,5	
JJGW12	40	58,1 \pm 1,9	12,5	63,9 (51,4 do 79,4)
	60	41,0 \pm 9,4	37,5	
	80	32,1 \pm 8,2	75,0	

Myszy umieszczano indywidualnie na kręcącym się pręcie (średnica 11cm, szybkość: 24 rpm) na okres 60 sekund (wcześniej trenowano je przez 3 dni, po 3 minuty). Rejestrowano czas, przez który zwierzę zdoła utrzymać się na pręcie. Dla każdego związku obliczono wartość ED₅₀ [220], tj. dawkę przy której 50% zwierząt nie jest w stanie utrzymać się na kręcącym się pręcie. Związki badane podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 30 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, n=8 myszy na grupę

Badania weryfikujące wpływ na układ sercowo-naczyniowy

5.1.15 Wpływ na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnych szczurów

Każdy związek badano wyjściowo w dawce 5 mg/kg i w przypadku zaobserwowania aktywności hipotensyjnej, dawkę zmniejszono o połowę, aż do zaniku istotnego działania hipotensyjnego. Wszystkie testowane pochodne obniżały istotnie ciśnienie tętnicze zwierząt.

Związek JJGW01 w dawce 1 mg/kg istotnie statystycznie obniżał ciśnienie skurczowe u szczura od 5 do 60 minuty od podania w granicach 9-15% ($F(1,70)=25,930$, $p<0,001$), a także ciśnienie rozkurczowe w 40-tej i 60-tej minucie od podania o odpowiednio 16 i 17% ($F(1,70)=7,603$, $p<0,05$) (Tab. 5.15).

JJGW02 w dawce 2,5 mg/kg istotnie statystycznie obniżał ciśnienie skurczowe u szczura od 5 do 30 minuty oraz od 50 do 60 minuty od podania w granicach 8-10% ($F(1,70)=14,300$, $p<0,01$), a także ciśnienie rozkurczowe od 5 do 40 minuty oraz w 60-tej minucie od podania w granicach 13-15% ($F(1,70)=17,520$, $p<0,01$) (Tab. 5.15).

Związek JJGW03 w dawce 5,0 mg/kg istotnie statystycznie obniżał ciśnienie skurczowe u szczura od 5 do 60 minuty od podania w granicach 16-21% ($F(1,70)=31,610$, $p<0,001$), a także ciśnienie rozkurczowe w 5-tej i 10-tej minucie od podania o odpowiednio 18 i 20% ($F(1,70)=4,059$, $p=0,072$) (Tab. 5.15).

JJGW07 w dawce 5,0 mg/kg istotnie statystycznie obniżał ciśnienie skurczowe u szczura od 5 do 60 minuty od podania w granicach 2-12% ($F(1,70)=35,520$, $p<0,001$), nie wpływając przy tym na ciśnienie rozkurczowe ($F(1,70)=21,790$, $p<0,001$) (Tab. 5.15).

Związek JJGW08 w dawce 1,0 mg/kg istotnie statystycznie obniżał ciśnienie skurczowe u szczura od 5 do 60 minuty od podania w granicach 7-14% ($F(1,70)=21,330$, $p<0,001$), a także ciśnienie rozkurczowe w 40-tej minucie od podania o 15% ($F(1,70)=8,139$, $p<0,05$) (Tab. 5.15).

JJGW09 w dawce 0,5 mg/kg istotnie statystycznie obniżał ciśnienie skurczowe u szczura od 5 do 50 minuty od podania w granicach 9-11% ($F(1,70)=11,940$, $p<0,01$), a także ciśnienie rozkurczowe od 5 do 60 minuty od podania w granicach 11-20% ($F(1,70)=30,420$, $p<0,001$) (Tab. 5.15).

Związek JJGW11 w dawce 2,5 mg/kg istotnie statystycznie obniżał ciśnienie skurczowe u szczura od 5 do 60 minuty od podania w granicach 7-14% ($F(1,70)=21,560$, $p<0,001$), a także ciśnienie rozkurczowe w 60-tej minucie od podania o 18% ($F(1,70)=6,612$, $p<0,05$) (Tab. 5.15).

JJGW12 w dawce 5,0 mg/kg istotnie statystycznie obniżał ciśnienie skurczowe u szczura w 50-tej minucie od podania o 13% ($F(1,70)=4,824$, $p=0,053$), nie wpływając przy tym na ciśnienie rozkurczowe ($F(1,70)=0,349$, $p=0,568$) (Tab. 5.15).

Tab. 5.15 Wpływ związków na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura

Związek	Ciśnienie	Dawka (mg/kg)	Czas obserwacji (min)							
			0	5	10	20	30	40	50	60
Kontrola	SBP	-	127,5 ± 3,3	128,7 ± 3,5	126,2 ± 2,4	124,3 ± 2,3	120,5 ± 1,9	120,0 ± 2,9	123,5 ± 3,2	121,3 ± 3,0
	DBP	-	92,2 ± 2,5	94,2 ± 2,3	92,2 ± 2,3	90,3 ± 2,4	88,8 ± 2,0	90,2 ± 4,7	87,3 ± 2,3	90,2 ± 4,9
JJGW01	SBP	0,5	130,7 ± 6,1	119,0 ± 5,5	115,7 ± 5,3	114,7 ± 3,6	114,5 ± 4,2	115,2 ± 5,2	116,8 ± 7,1	113,8 ± 6,6
		1,0	112,5 ± 4,7	102,5 ± 3,9***	100,3 ± 4,2***	99,7 ± 4,6***	98,2 ± 4,2**	95,7 ± 5,4***	95,5 ± 4,6***	96,5 ± 4,3***
	DBP	0,5	95,3 ± 5,1	88,5 ± 5,8	85,0 ± 5,6	84,8 ± 3,5	84,3 ± 2,8	86,0 ± 4,2	88,3 ± 6,3	86,8 ± 6,3
		1,0	87,7 ± 4,6	80,2 ± 4,4	79,0 ± 4,8	77,5 ± 4,9	75,7 ± 4,3	73,8 ± 5,7*	72,7 ± 4,7	73,2 ± 4,6*
JJGW02	SBP	1,0	116,7 ± 5,0	112,5 ± 4,1	109,7 ± 3,0	108,5 ± 4,2	104,2 ± 3,6	107,7 ± 4,7	108,7 ± 5,3	111,0 ± 7,3
		2,5	114,3 ± 6,4	103,2 ± 5,3***	104,2 ± 5,4**	102,8 ± 5,5**	103,7 ± 4,4*	106,5 ± 4,3	103,2 ± 3,8**	105,2 ± 3,9*
	DBP	1,0	87,7 ± 6,1	82,7 ± 6,5	83,3 ± 4,2	80,0 ± 5,7	73,7 ± 4,3	75,0 ± 5,4	73,7 ± 5,7	76,7 ± 7,8
		2,5	84,8 ± 4,9	72,0 ± 3,8***	72,8 ± 4,7**	73,0 ± 3,9**	72,3 ± 3,3*	73,8 ± 3,9*	73,7 ± 3,6	73,7 ± 3,2*
JJGW03	SBP	2,5	123,8 ± 7,1	112,5 ± 5,6	109,8 ± 5,5	108,8 ± 6,4	111,8 ± 8,4	111,2 ± 9,1	107,7 ± 8,0	109,2 ± 8,9
		5,0	128,5 ± 3,5	108,0 ± 2,7***	104,3 ± 2,6***	101,3 ± 1,9***	102,3 ± 2,8***	104,3 ± 1,6**	106,0 ± 3,2**	107,3 ± 2,5***
	DBP	2,5	89,3 ± 6,4	83,3 ± 5,2	84,8 ± 6,0	86,0 ± 6,5	85,5 ± 6,0	83,7 ± 6,4	81,2 ± 6,1	79,5 ± 6,3
		5,0	101,5 ± 2,5	83,2 ± 2,0*	81,2 ± 1,6*	82,0 ± 1,7	83,5 ± 1,7	85,5 ± 2,4	86,7 ± 2,5	87,5 ± 2,6
JJGW07	SBP	2,5	120,0 ± 3,8	114,0 ± 4,9	109,0 ± 4,2	107,5 ± 4,7	106,5 ± 5,0	106,2 ± 5,4	103,3 ± 5,5	105,2 ± 6,2
		5,0	116,7 ± 1,1	113,8 ± 2,3**	109,5 ± 2,3***	105,2 ± 2,6***	102,8 ± 2,8***	104,7 ± 2,3**	104,7 ± 2,3***	104,3 ± 2,3***
	DBP	2,5	92,7 ± 4,8	89,0 ± 4,9	84,7 ± 4,9	81,7 ± 5,3	80,2 ± 5,9	78,7 ± 6,6	77,5 ± 6,8	76,3 ± 7,3
		5,0	85,3 ± 1,7	88,5 ± 2,5	84,2 ± 2,7	81,2 ± 2,2	79,2 ± 2,2	80,3 ± 1,2	79,8 ± 1,0	80,0 ± 0,9
JJGW08	SBP	0,5	125,2 ± 6,7	118,2 ± 4,7	115,7 ± 4,2	114,3 ± 4,7	115,8 ± 4,4	114,2 ± 5,2	115,7 ± 4,7	117,8 ± 4,6
		1,0	111,8 ± 4,5	104,0 ± 4,5***	103,2 ± 5,0**	98,0 ± 4,4***	98,7 ± 5,0**	98,0 ± 4,8**	96,2 ± 4,9***	98,8 ± 5,5**
	DBP	0,5	95,8 ± 8,4	95,5 ± 6,3	94,0 ± 5,9	90,3 ± 6,4	86,2 ± 6,2	85,2 ± 6,4	85,0 ± 5,7	87,0 ± 6,8
		1,0	83,3 ± 6,1	76,8 ± 4,6	75,0 ± 4,4	73,0 ± 4,7	72,2 ± 5,1	71,0 ± 6,5*	72,7 ± 6,5	72,8 ± 7,2

Zwierzęta znieczulano tiopentalem (75 mg/kg, *i.p.*). Związki badane podawano dożylnie (*i.v.*), do żyły ogonowej). Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.v.*). Po 15 minutach stabilizacji mierzono ciśnienie tętnicze krwi bezpośrednio w tętnicy szyjnej wspólnej, przez 60 minut od momentu podania związków. SBP – ciśnienie skurczowe krwi, DBP – ciśnienie rozkurczowe krwi. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=6 szczurów na grupę. Analiza statystyczna: dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami (Bonferroni *post hoc*) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. pomiar kontrolny przed podaniem związku

Tab. 5.15 Wpływ związków na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura cd.

Związek	Ciśnienie	Dawka (mg/kg)	Czas obserwacji (min)							
			0	5	10	20	30	40	50	60
Kontrola	SBP	-	127,5 ± 3,3	128,7 ± 3,5	126,2 ± 2,4	124,3 ± 2,3	120,5 ± 1,9	120,0 ± 2,9	123,5 ± 3,2	121,3 ± 3,0
	DBP	-	92,2 ± 2,5	94,2 ± 2,3	92,2 ± 2,3	90,3 ± 2,4	88,8 ± 2,0	90,2 ± 4,7	87,3 ± 2,3	90,2 ± 4,9
JJGW09	SBP	0,25	115,7 ± 4,4	110,7 ± 4,1	109,0 ± 4,4	107,2 ± 5,6	105,2 ± 5,6	106,3 ± 5,9	106,8 ± 6,5	108,0 ± 7,4
		0,5	112,0 ± 3,8	100,0 ± 6,6***	101,2 ± 6,2**	99,5 ± 6,4**	99,5 ± 7,0*	99,3 ± 6,9*	102,2 ± 6,8*	98,7 ± 4,0
	DBP	0,25	85,2 ± 4,1	84,5 ± 4,8	75,8 ± 6,7	75,3 ± 6,2	75,2 ± 5,7	76,0 ± 5,7	77,0 ± 6,5	76,5 ± 6,7
		0,5	78,2 ± 3,2	62,7 ± 5,4***	67,2 ± 3,3***	67,3 ± 3,8***	67,8 ± 4,0**	66,2 ± 4,4***	68,2 ± 4,7**	69,3 ± 5,3**
JJGW11	SBP	1,0	118,2 ± 4,0	116,2 ± 3,5	113,8 ± 3,7	111,5 ± 4,2	111,0 ± 4,4	110,0 ± 4,7	110,3 ± 4,4	110,8 ± 4,3
		2,5	116,7 ± 3,3	108,5 ± 3,6**	103,3 ± 3,9***	102,3 ± 4,1**	101,3 ± 3,7**	103,0 ± 4,2*	103,5 ± 5,3**	100,2 ± 6,5***
	DBP	1,0	86,8 ± 3,1	81,3 ± 5,9	82,0 ± 4,1	82,3 ± 3,6	83,0 ± 3,3	82,5 ± 3,4	81,7 ± 3,4	81,5 ± 3,4
		2,5	88,7 ± 4,2	84,7 ± 4,1	81,2 ± 3,5	78,5 ± 4,1	77,3 ± 4,0	79,2 ± 4,3	77,7 ± 5,3	73,0 ± 6,6*
JJGW12	SBP	2,5	122,2 ± 6,4	120,7 ± 5,6	114,5 ± 4,3	109,7 ± 3,8	106,5 ± 5,4	108,8 ± 4,8	110,0 ± 3,1	110,5 ± 3,3
		5,0	122,5 ± 4,9	120,7 ± 4,0	114,5 ± 3,7	112,8 ± 4,1	111,5 ± 4,2	113,0 ± 4,9	107,0 ± 5,2*	109,8 ± 5,0
	DBP	2,5	95,0 ± 6,5	94,5 ± 6,7	87,5 ± 9,4	83,5 ± 9,2	84,0 ± 8,7	87,8 ± 6,8	89,3 ± 5,5	89,2 ± 5,7
		5,0	95,7 ± 2,4	87,7 ± 2,8	89,3 ± 3,3	88,5 ± 3,7	87,8 ± 3,6	87,8 ± 3,6	85,8 ± 3,3	86,7 ± 4,3

Zwierzęta znieczulano tiopentalem (75 mg/kg, *i.p.*). Związki badane podawano dożylnie (*i.v.*), do żyły ogonowej). Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.v.*). Po 15 minutach stabilizacji mierzono ciśnienie tętnicze krwi bezpośrednio w tętnicy szyjnej wspólnej, przez 60 minut od momentu podania związków. SBP – ciśnienie skurczowe krwi, DBP – ciśnienie rozkurczowe krwi. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=6 szczurów na grupę. Analiza statystyczna: dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami (Bonferroni *post hoc*) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. pomiar kontrolny przed podaniem związku

5.1.16 Wpływ na presyjne działanie metoksaminy

Testowane pochodne podawano w najniższej dawce, która powodowała obniżenie ciśnienia tętniczego. Wszystkie badane związki istotnie statystycznie zmniejszały presyjne działanie po podaniu metoksaminy.

Związek JJGW01 w dawce 0,5 mg/kg istotnie zmniejszał presyjne działanie metoksaminy o około 81% ($t(5)=7,103$, $p<0,001$) (Ryc. 5.1.A).

JJGW02 w dawce 1,0 mg/kg redukował presyjne działanie metoksaminy o 100% ($t(5)=5,225$, $p<0,01$) (Ryc. 5.1.B).

Związek JJGW03 w dawce 2,5 mg/kg osłabiał presyjną odpowiedź po podaniu metoksaminy o około 99% ($t(5)=15,610$, $p<0,0001$) (Ryc. 5.1.C).

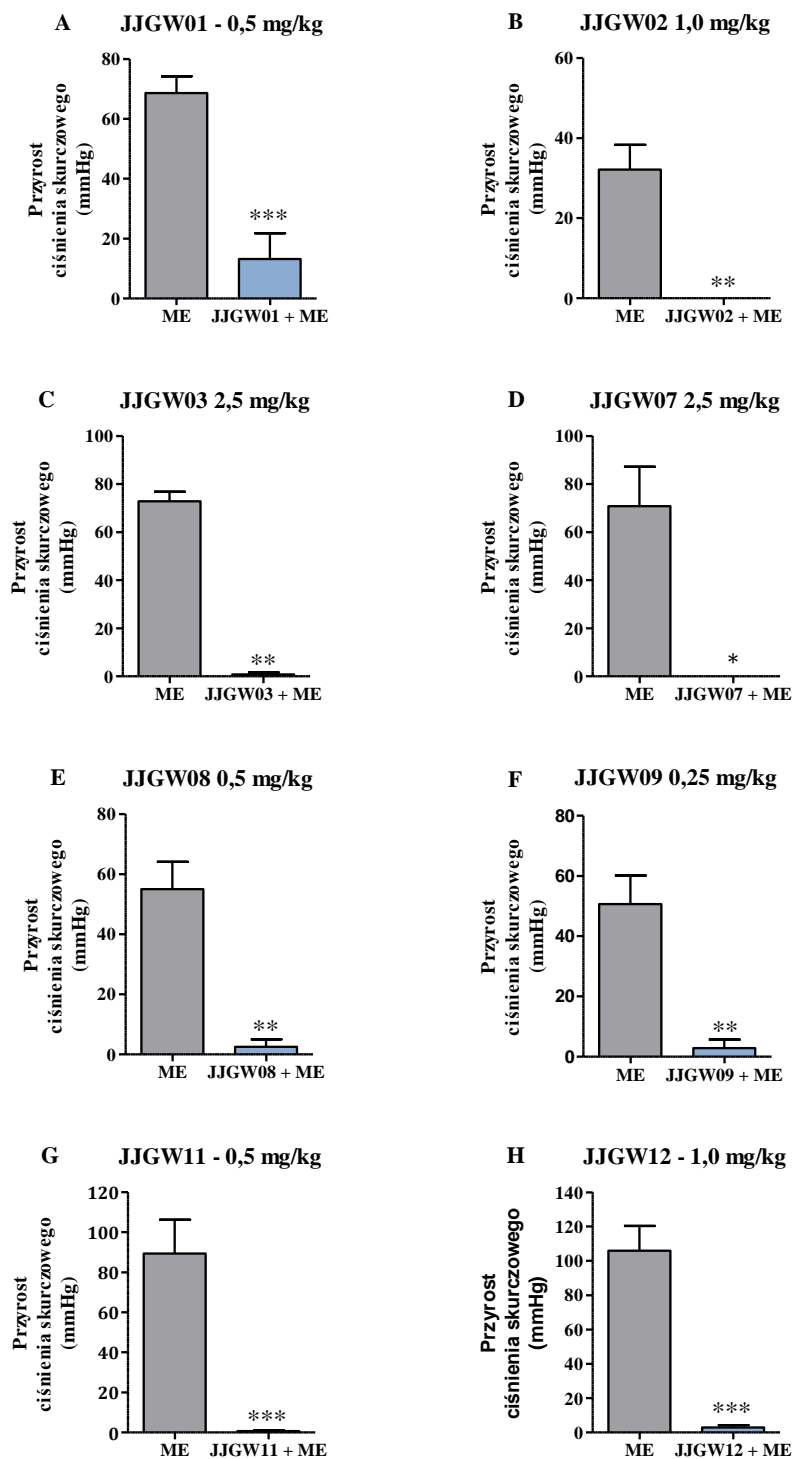
JJGW07 w dawce 2,5 mg/kg istotnie zmniejszał presyjne działanie metoksaminy o 100% ($t(5)=4,294$, $p<0,01$) (Ryc. 5.1.D).

Związek JJGW08 w dawce 0,5 mg/kg obniżał presyjne działanie po podaniu metoksaminy o około 95% ($t(5)=5,103$, $p<0,01$) (Ryc. 5.1.E).

JJGW09 w dawce 0,25 mg/kg zmniejszał presyjne działanie metoksaminy o około 94% ($t(5)=5,757$, $p<0,01$) (Ryc. 5.1.F).

Związek JJGW11 w dawce 0,5 mg/kg osłabiał presyjną odpowiedź po podaniu metoksaminy o około 99% ($t(5)=5,287$, $p<0,01$) (Ryc. 5.1.G).

JJGW12 w dawce 1 mg/kg redukował presyjne działanie metoksaminy o około 97% ($t(5)=7,252$, $p<0,001$) (Ryc. 5.1.H).



Ryc. 5.1 Wpływ związków na presyjne działanie po podaniu metoksaminy

Zwierzęta znieczulano tiopentalem (75 mg/kg, *i.p.*). Związki badane i metoksaminę (ME) podawano dożylnie, do żyły ogonowej (*i.v.*). Po zapisie kontrolnym podawano metoksaminę (150 µg/kg), następnie badany związek (w najniższej dawce, która powodowała obniżenie ciśnienia tętniczego) i po 5 minutach ponownie podawano metoksaminę, każdorazowo rejestrując zmiany ciśnienia skurczowego. Ciśnienie tętnicze mierzono bezpośrednio w tętnicy szyjnej wspólnej, po 15 minutach stabilizacji. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=6 szczurów na grupę. Analiza statystyczna: sparowany test t-Studenta *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. początkowa maksymalna odpowiedź (przed podaniem związku)

5.1.17 Wpływ na prawidłowy elektrokardiogram u szczurów

Analizę EKG badanych związków wykonano po podaniu dawki 5 mg/kg. Dawkę tę ustalono na podstawie wyników uzyskanych z pomiaru ciśnienia tętniczego, gdyż była to najwyższa przebadana dawka istotnie obniżająca ciśnienie u zwierząt.

Żadna z testowanych pochodnych nie wpływała istotnie na odstęp PR (JJGW01: (F(4,20)=0,639, p=0,641), JJGW02: (F(4,20)=1,280, p=0,311), JJGW03: (F(4,20)=1,426, p=0,262), JJGW07: (F(4,20)=1,269, p=0,315), JJGW08: (F(4,20)=1,060, p=0,402), JJGW09: (F(4,20)=1,280, p=0,311), JJGW11: (F(4,20)=0,370, p=0,827), JJGW12: (F(4,20)=0,486, p=0,746)). Badane związki nie wpływały również na zespół QRS (JJGW01: (F(4,20)=0,920, p=0,472), JJGW02: (F(4,20)=0,846, p=0,513), JJGW03: (F(4,20)=0,299, p=0,875), JJGW07: (F(4,20)=0,730, p=0,582), JJGW08: (F(4,20)=0,672, p=0,619), JJGW09: (F(4,20)=0,990, p=0,436), JJGW11: (F(4,20)=0,815, p=0,530), JJGW12: (F(4,20)=0,519, p=0,723)) oraz kalkulowany odstęp QT (JJGW01: (F(4,20)=2,345, p=0,090) JJGW02: (F(4,20)=1,454, p=0,253), JJGW03: (F(4,20)=1,540, p=0,229), JJGW07: (F(4,20)=0,783, p=0,549), JJGW08: (F(4,20)=4,480, p=0,010), JJGW09: (F(4,20)=4,193, p=0,013), JJGW11: (F(4,20)=1,181, p=0,349), JJGW12: (F(4,20)=0,785, p=0,549)) (Tab. 5.16).

Natomiast związki JJGW02, JJGW08, JJGW09 i JJGW11 istotnie zmniejszyły częstotliwość pracy serca u zwierząt, dla związku JJGW02 od 5-tej minuty od podania o około 10-16% (F(4,20)=10,580, p<0,0001), dla JJGW08 od 1-ej minuty od podania o około 10-16% (F(4,20)=8,975, p<0,001), dla JJGW09 od 5-tej minuty od podania o około 12-19% (F(4,20)=19,540, p<0,0001) oraz dla JJGW11 w 10-tej i 15-tej minucie od podania o odpowiednio 8 i 10% (F(4,2)=8,106, p<0,001). Pozostałe związki nie wpływały na częstotliwość pracy serca szczurów (JJGW01: (F(4,20)=1,512, p=0,236), JJGW03: ((F(4,20)=0,664, p=0,625), JJGW07: (F(4,20)=1,425, p=0,262), JJGW12: (F(4,20)=1,605, p=0,212)) (Tab.5.16).

Tab. 5.16 Wpływ związków w dawce 5 mg/kg na prawidłowy elektrokardiogram u szczura

Związek	Parametr	Czas obserwacji (min)				
		0	1	5	10	15
JJGW01	PR	42,3 ± 1,4	40,3 ± 1,0	42,3 ± 0,8	41,3 ± 1,0	41,0 ± 1,3
	QRS	49,3 ± 3,2	50,0 ± 2,1	46,7 ± 2,3	48,0 ± 1,7	50,3 ± 1,9
	QTc	196,0 ± 5,8	201,7 ± 4,9	193,7 ± 6,1	186,6 ± 3,7	190,6 ± 5,9
	HR	311,8 ± 4,7	318,0 ± 6,1	318,0 ± 11,6	324,6 ± 9,4	324,0 ± 9,4
JJGW02	PR	42,6 ± 0,8	45,5 ± 2,4	41,7 ± 0,7	42,2 ± 0,7	44,8 ± 2,4
	QRS	36,0 ± 0,5	35,4 ± 0,4	35,2 ± 0,5	36,1 ± 0,7	35,2 ± 0,3
	QTc	183,3 ± 2,9	184,4 ± 3,1	175,4 ± 5,7	173,2 ± 6,4	175,1 ± 6,5
	HR	311,1 ± 9,9	307,4 ± 10,0	278,7 ± 15,1*	265,0 ± 12,3***	262,0 ± 15,2***
JJGW03	PR	41,6 ± 0,9	41,3 ± 0,8	41,4 ± 0,6	40,2 ± 0,7	40,0 ± 0,2
	QRS	39,6 ± 1,9	40,1 ± 2,0	39,3 ± 1,6	40,8 ± 2,9	40,4 ± 2,1
	QTc	177,6 ± 4,9	192,9 ± 8,3	188,7 ± 6,6	174,8 ± 3,0	178,1 ± 6,1
	HR	286,6 ± 18,7	294,5 ± 16,3	289,1 ± 8,2	279,9 ± 6,4	271,9 ± 7,4
JJGW07	PR	40,7 ± 0,8	42,3 ± 0,6	40,0 ± 0,9	40,7 ± 1,5	40,7 ± 0,7
	QRS	47,0 ± 2,6	47,0 ± 2,9	49,7 ± 3,2	48,7 ± 3,0	48,7 ± 3,7
	QTc	19,5 ± 3,3	195,4 ± 2,4	190,8 ± 1,7	196,3 ± 3,9	192,4 ± 3,1
	HR	328,7 ± 3,8	342,7 ± 5,5	341,2 ± 4,7	333,2 ± 8,5	336,3 ± 8,5
JJGW08	PR	44,3 ± 2,1	41,9 ± 0,6	43,8 ± 0,6	41,9 ± 1,3	43,7 ± 0,5
	QRS	35,2 ± 1,2	34,8 ± 0,9	36,1 ± 0,7	34,5 ± 1,1	35,6 ± 0,8
	QTc	190,9 ± 6,2	201,8 ± 6,2	185,0 ± 2,3	188,9 ± 7,2	182,1 ± 3,7
	HR	330,7 ± 18,6	288,9 ± 13,5**	297,3 ± 8,8**	290,6 ± 14,9**	277,5 ± 15,4***
JJGW09	PR	41,5 ± 0,5	41,1 ± 0,2	42,7 ± 0,6	42,4 ± 0,9	41,7 ± 0,4
	QRS	35,9 ± 0,8	35,6 ± 0,6	36,7 ± 0,5	35,1 ± 0,8	36,0 ± 0,8
	QTc	193,2 ± 6,1	195,2 ± 7,1	181,3 ± 1,8	178,4 ± 2,7	178,1 ± 5,4
	HR	331,0 ± 7,0	327,0 ± 10,8	292,3 ± 12,1**	274,5 ± 7,9***	269,1 ± 9,1***
JJGW11	PR	45,8 ± 2,9	45,8 ± 2,9	47,1 ± 2,3	47,4 ± 2,0	47,6 ± 2,1
	QRS	38,5 ± 1,5	43,9 ± 4,8	41,3 ± 1,2	42,4 ± 1,7	41,7 ± 2,2
	QTc	188,2 ± 5,0	199,6 ± 6,8	197,3 ± 7,6	193,6 ± 9,0	184,1 ± 6,9
	HR	281,3 ± 20,7	276,1 ± 25,1	266,5 ± 23,7	258,8 ± 22,4**	252,4 ± 20,5***
JJGW12	PR	44,1 ± 2,5	44,8 ± 1,8	43,6 ± 0,5	45,9 ± 1,0	45,5 ± 1,3
	QRS	41,9 ± 0,9	44,3 ± 3,2	44,5 ± 1,5	44,2 ± 1,0	45,2 ± 2,4
	QTc	190,8 ± 6,2	201,8 ± 7,9	194,3 ± 6,9	190,3 ± 10,6	195,8 ± 10,4
	HR	254,6 ± 16,8	269,0 ± 19,1	256,8 ± 19,2	255,2 ± 21,9	250,2 ± 21,0

Zwierzęta znieczulano tiopentalem (75 mg/kg, *i.p.*). Związki badane w dawce 5 mg/kg podawano dożylnie (*i.v.*), do żyły ogonowej. Mierzono parametry pracy serca przez 15 minut od podania związków. HR – częstotliwość pracy serca (liczba uderzeń/min), PR, QRS, QTc (msek). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM, n=6 szczurów na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami (Dunnet *post hoc*) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs pomiar kontrolny przed podaniem związku

5.2 Rozszerzone badania farmakologiczne dla wyselekcjonowanych związków: JJGW07 i JJGW08

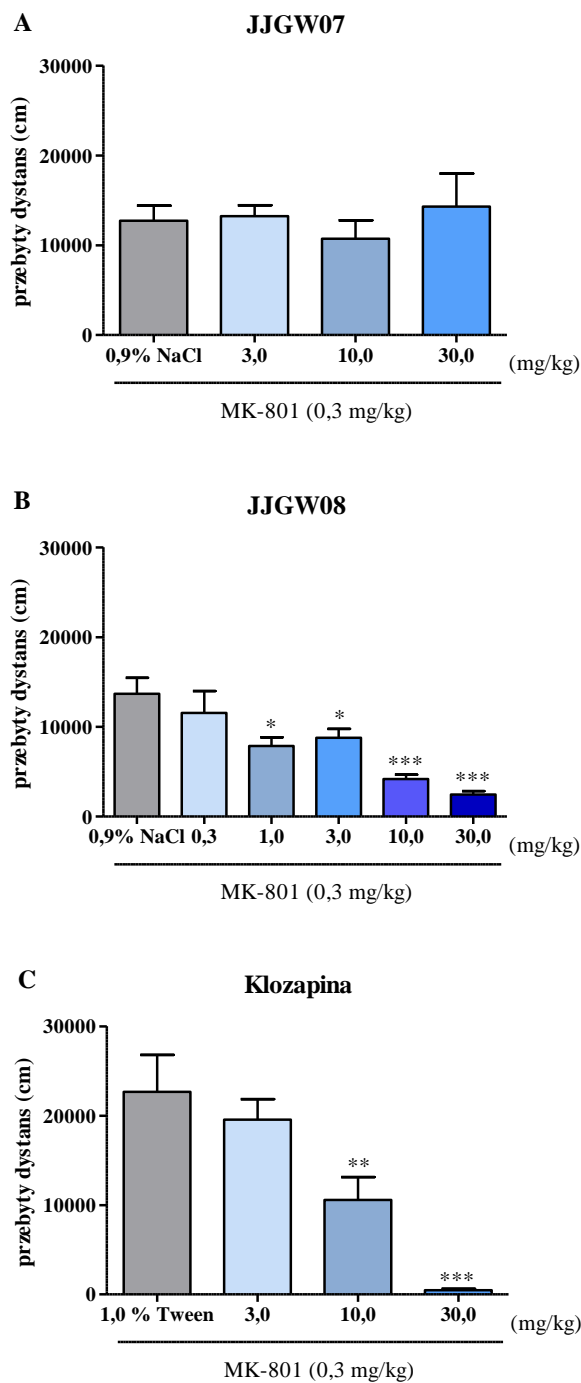
5.2.1 Potencjalna aktywność przeciwpsychotyczna w teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów

Test przeprowadzono dla związków JJGW07 i JJGW08 w dawkach wyjściowych 30,0, 10,0 oraz 3,0 mg/kg, które ewentualnie zmniejszono proporcjonalnie, aż do zaniku obserwowanych właściwości przeciwpsychotycznych.

Związek JJGW07 w testowanych dawkach nie zmniejszał nadmiernej ruchliwości zwierząt indukowanej podaniem MK-801 podczas 30 minut trwania testu ($F(3,28)=0,415$, $p=0,744$) (Ryc. 5.2.A).

Związek JJGW08 w zakresie dawek 1,0-30,0 mg/kg istotnie statystycznie redukował hiperlokomocję indukowaną podaniem MK-801 u szczurów w granicach 36-82%, w trakcie 30 minut trwania eksperymentu ($F(5,42)=9,591$, $p<0,001$) (Ryc. 5.2.B).

Klozapina w dawkach 10,0 i 30,0 mg/kg istotnie statystycznie zmniejszała nadmierną ruchliwość zwierząt indukowaną podaniem MK-801, o odpowiednio 53 i 98% podczas 30 minut trwania testu ($F(3,28)=13,830$, $p<0,0001$) (Ryc. 5.2.C).



Ryc. 5.2 Wpływ związków na aktywność lokomotoryczną w teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów

Po okresie habituacji (30 minut, 24 h przed testem), mierzono aktywność lokomotoryczną indywidualnie dla każdego zwierzęcia, w specjalnych aparatach, w ściśle określonych warunkach. Pokonany dystans (w cm) monitorowano w 10-minutowych interwałach przez 30 minut, za pomocą skomputeryzowanego systemu śledzącego ruch i zachowanie zwierząt. Związki badane i kłozapinę podawano dootrzewnowo (*i.p.*) odpowiednio 30 lub 60 minut przed testem, natomiast MK-801 (0,3 mg/kg) podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 15 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) lub 1,0% Tween (*i.p.*) w przypadku kłozapiny oraz MK-801 (0,3 mg/kg, *i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, n=7-8 szczurów na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Newman-Keuls *post hoc*) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. grupa kontrolna

5.2.2 Potencjalna aktywność przeciwpsychotyczna w teście bramkowania przed sygnałowego po podaniu MK-801 u szczurów

Test przeprowadzono dla związków JJGW07 i JJGW08 w dawkach wyjściowych 30,0, 10,0 oraz 3,0 mg/kg.

Żaden z badanych związków nie odwracał deficytów bramkowania sensomotorycznego wywołanych podaniem MK-801 u zwierząt w testowanych dawkach, utrzymując procent hamowania reakcji wzdrygnięcia („*startle*”) w granicach -3,3-19,2% dla związku JJGW07 (Ryc.5.3.1.A) oraz -0,2-24,4% dla związku JJGW08 (Ryc.5.3.1.B).

Analiza statystyczna dla pochodnej JJGW07 wykazała istotny efekt bramkowania przed sygnałowego ($F(1,28)=33,130$, $p<0,0001$) i równocześnie brak istotnego wpływu związku ($F(3,28)=0,455$, $p=0,716$) oraz brak interakcji ($F(3,28)=1,436$, $p=0,253$) (Ryc. 5.3.1.A.). Dodatkowo, w przeprowadzonej analizie *post-hoc* nie wykryto istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 5.3.1.A).

W przypadku związku JJGW08 także zaobserwowano istotny efekt bramkowania przed sygnałowego ($F(1,27)=17,610$, $p<0,001$) oraz brak istotnego wpływu związku ($F(3,27)=2,839$, $p=0,057$) i brak interakcji ($F(3,27)=1,159$, $p=0,344$) (Ryc. 5.3.1.B). Przeprowadzona analiza *post-hoc* wykazała istotną różnicę pomiędzy dwoma grupami, a konkretnie istotne obniżenie wartości %PPI w przypadku grupy leczonej dawką 3,0 mg/kg, w stosunku do grupy leczonej dawką 10,0 mg/kg ($p<0,05$), dla pomiaru przy natężeniu 90 dB (Ryc. 5.3.1.B).

Klozapina w zakresie dawek 3,0-30,0 mg/kg nie odwracała deficytów bramkowania sensomotorycznego indukowanych podaniem MK-801 u szczurów, utrzymując procent hamowania reakcji wzdrygnięcia w granicach 8,7-36,2% (Ryc. 5.3.1.C). Analiza statystyczna wykazała istotny efekt bramkowania przed sygnałowego ($F(1,28)=21,980$, $p<0,0001$), przy równoczesnym braku istotnego wpływu związku ($F(3,28)=0,922$, $p=0,443$) oraz braku interakcji ($F(3,28)=2,102$, $p=0,123$) (Ryc. 5.3.1.C). Co więcej, w analizie *post-hoc* wykazano istotne obniżenie wartości %PPI w przypadku grupy leczonej dawką 3,0 oraz 10,0 mg/kg, w stosunku do grupy leczonej dawką 30,0 mg/kg ($p<0,05$), dla pomiaru przy natężeniu 84 dB (Ryc. 5.3.1.C).

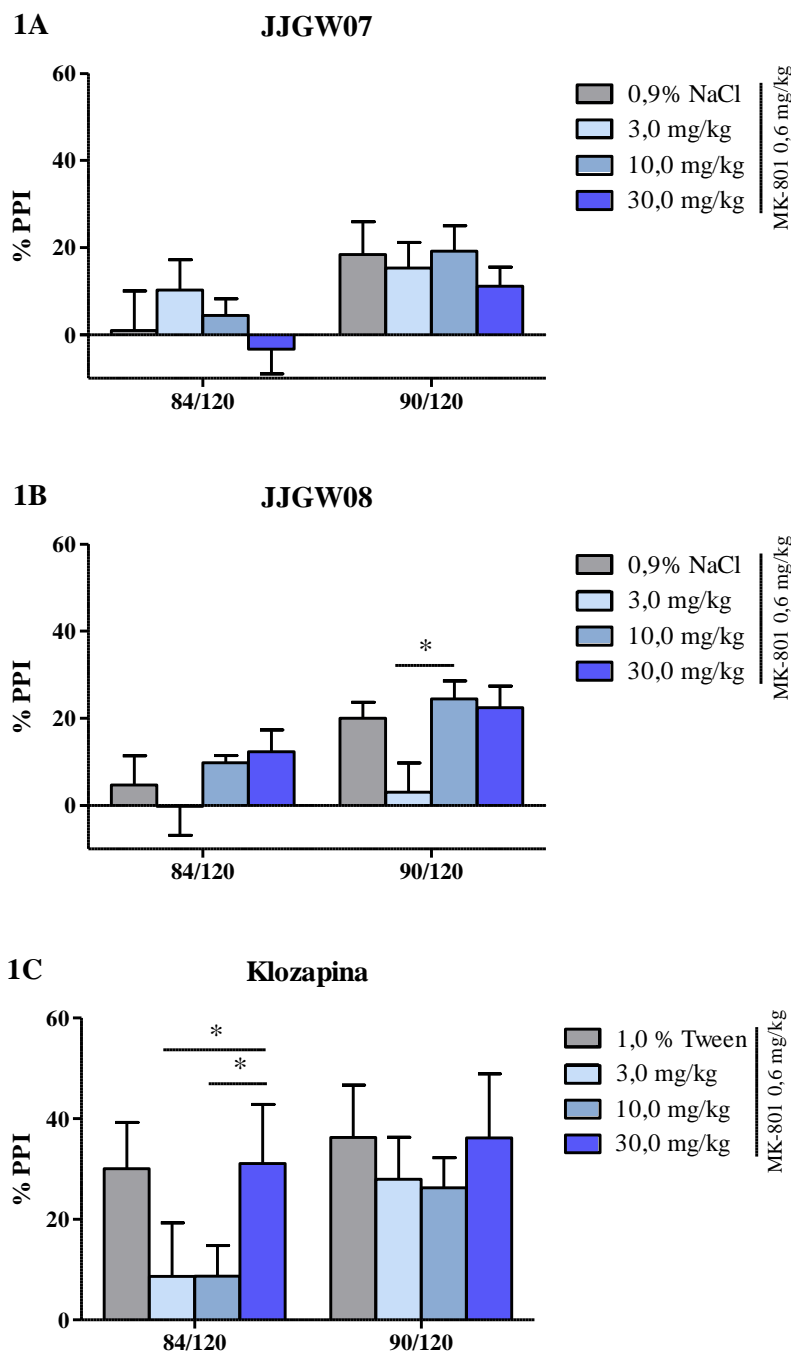
Zmiany w wartościach reakcji wzdrygnięcia w zależności od natężenia dźwięku przedstawiono na Rycinie 5.3.2. Dla obu badanych związków zaobserwowano istotne

zwiększenie amplitudy odruchu wzdrygnięcia w grupie badanej przy natężeniu 120 dB (Ryc. 5.3.2).

Analiza statystyczna dla związku JJGW07 wykazała istotny efekt reakcji wzdrygnięcia ($F(3,28)=328,600$, $p<0,001$), przy braku stwierdzonego wpływu związku ($F(3,28)=0,479$, $p=0,700$) oraz braku interakcji ($F(9,28)=0,611$, $p=0,785$) (Ryc. 5.3.2.A). Analiza *post-hoc* wskazała na istotne różnice pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (70 dB, 84 dB, 90 dB), a grupą o natężeniu 120 dB ($p<0,001$) (Ryc. 5.3.2.A).

Dla związku JJGW08 zaobserwowano istotny efekt reakcji wzdrygnięcia ($F(3,27)=233,100$, $p<0,001$) oraz brak wpływu związku ($F(3,27)=0,234$, $p=0,872$) i brak interakcji ($F(9,27)=0,787$, $p=0,629$) (Ryc. 5.3.2.B). Przeprowadzona analiza *post-hoc* również wykazała istotne różnice pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (70 dB, 84 dB, 90 dB), a grupą o natężeniu 120 dB ($p<0,001$) (Ryc. 5.3.2.B).

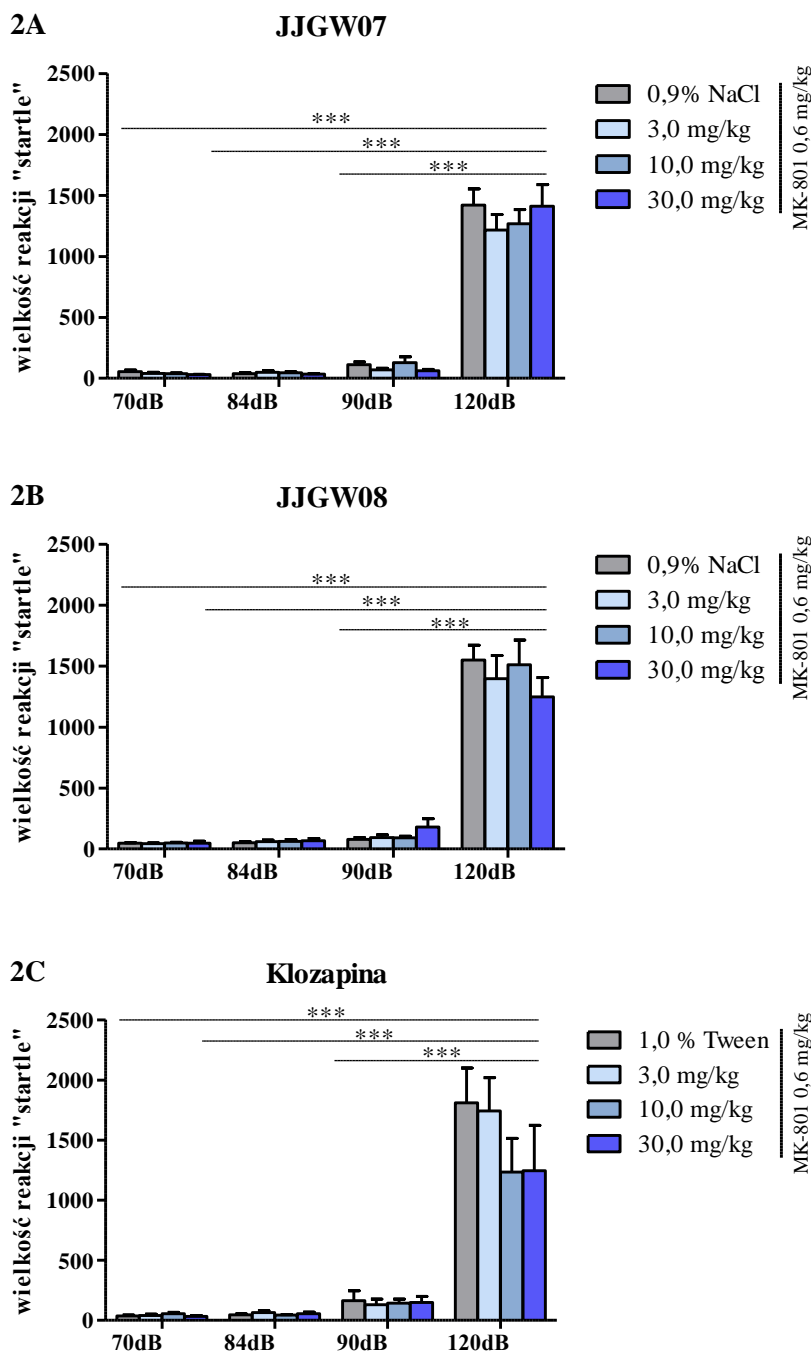
Klozapina powodowała istotne zwiększenie amplitudy odruchu wzdrygnięcia w grupie badanej przy natężeniu 120 dB (Ryc. 5.3.2.C). Analiza statystyczna wykazała istotny efekt reakcji wzdrygnięcia ($F(3,28)=90,970$, $p<0,001$), przy braku stwierdzonego wpływu związku ($F(3,28)=0,775$, $p=0,518$) oraz braku interakcji ($F(9,28)=1,088$, $p=0,380$) (Ryc. 5.3.2.C). Analiza *post-hoc* wskazała na istotne różnice pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (70 dB, 84 dB, 90 dB), a grupą o natężeniu 120 dB ($p<0,001$) (Ryc. 5.3.2.C).



Ryc. 5.3 Wpływ związków na hamowanie reakcji „startle” (1) oraz na zmiany wielkości „startle” (2) w teście bramkowania przed sygnałem po podaniu MK-801 u szczurów

Test przeprowadzono w specjalnych dźwiękoszczelnych aparatach, gdzie rejestrowano amplitudę reakcji „startle”. Sesja eksperymentalna (po 5-minutowym okresie habituacji) składała się z zaprogramowanych zdarzeń, ze ściśle określonymi parametrami. Mierzono intensywność wzdrzygnięcia dla każdego bodźca użytego w sesji. Związki badane i klozapinę podawano dootrzewnowo (*i.p.*) odpowiednio 30 lub 60 minut przed testem, natomiast MK-801 (0,6 mg/kg) podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 15 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) lub 1,0% Tween (*i.p.*) w przypadku klozapiny oraz MK-801 (0,6 mg/kg, *i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, $n=7-8$ szczurów na grupę. Analiza statystyczna: dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami (Bonferroni *post hoc*), * $p<0,05$, *** $p<0,001$ vs. zaznaczona grupa badana, %PPI – procent bramkowania przed sygnałem

Wielkość reakcji „startle” przedstawiono w jednostkach arbitralnych producenta



Ryc. 5.3 Wpływ związków na hamowanie reakcji „startle” (1) oraz na zmiany wielkości „startle” (2) w teście bramkowania przed sygnałowym po podaniu MK-801 u szczurów cd.

Test przeprowadzono w specjalnych dźwiękoszczelnych aparatach, gdzie rejestrowano amplitudę reakcji „startle”. Sesja eksperymentalna (po 5-minutowym okresie habituacji) składała się z zaprogramowanych zdarzeń, ze ściśle określonymi parametrami. Mierzono intensywność wzdrzygnięcia dla każdego bodźca użytego w sesji. Związki badane i klopazynę podawano dootrzewnowo (*i.p.*) odpowiednio 30 lub 60 minut przed testem, natomiast MK-801 (0,6 mg/kg) podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 15 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) lub 1,0% Tween (*i.p.*) w przypadku klopazyny oraz MK-801 (0,6 mg/kg, *i.p.*). Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, $n=7-8$ szczurów na grupę. Analiza statystyczna: dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami (Bonferroni *post hoc*), $*p<0,05$, $***p<0,001$ vs. zaznaczona grupa badana, %PPI – procent bramkowania przed sygnałowym

Wielkość reakcji „startle” przedstawiono w jednostkach arbitralnych producenta

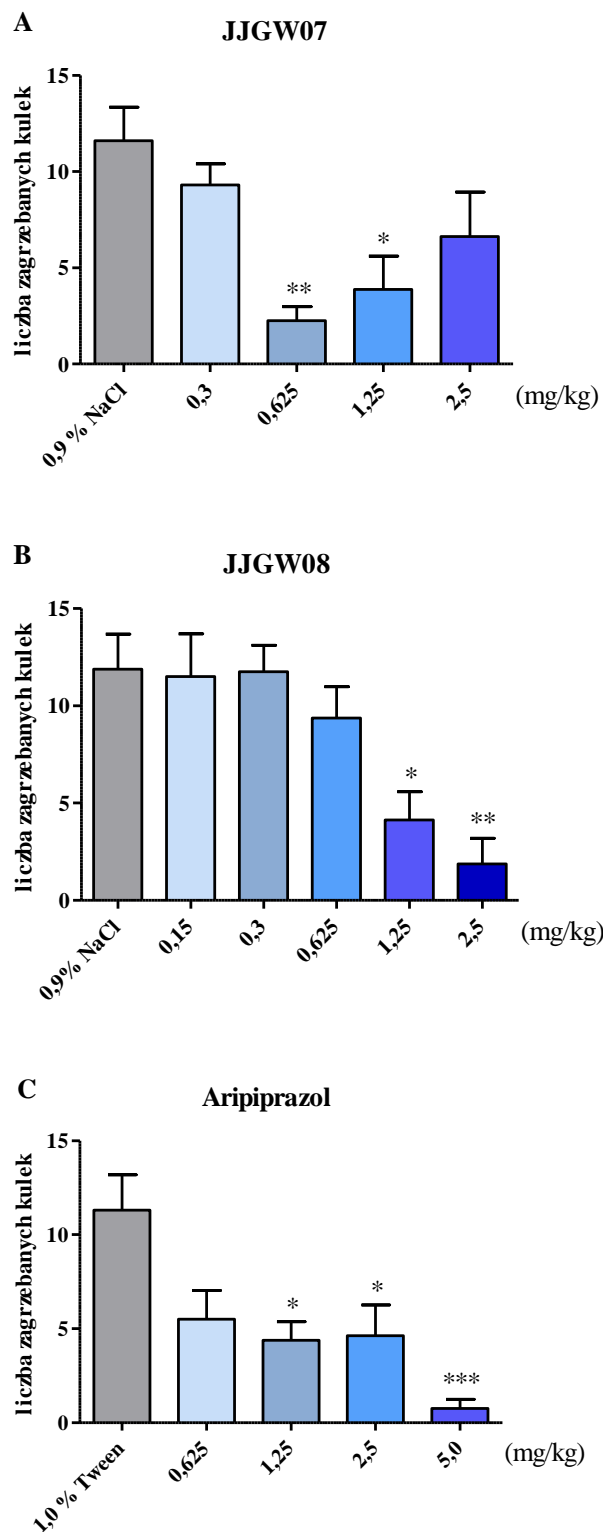
5.2.3 Potencjalna aktywność przeciwłękowa w teście zagrzebywania u myszy

Test przeprowadzono dla związków JJGW07 i JJGW08 w dawkach aktywnych przeciwpysychotycznie u myszy.

Związek JJGW07 w dawkach 0,625, 1,25 i 2,5 mg/kg istotnie statystycznie zmniejszał liczbę zagrzebanych kulek o odpowiednio 80, 66 i 43% w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas 30 minut trwania testu ($F(4,39)=5,749$, $p=0,001$) (Ryc. 5.4.A).

Związek JJGW08 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg istotnie statystycznie zmniejszał liczbę zagrzebanych kulek o odpowiednio 65 i 84% w porównaniu do grupy kontrolnej, w czasie 30 minut trwania eksperymentu ($F(5,44)=6,671$, $p=0,0001$) (Ryc. 5.4.B).

Aripiprazol w dawkach 1,25, 2,5 i 5,0 mg/kg istotnie statystycznie zmniejszał liczbę zagrzebanych kulek o odpowiednio 61, 69 i 93% w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas 30 minut trwania testu ($F(4,37)=7,363$, $p<0,001$) (Ryc. 5.4.C).



Ryc. 5.4 Wpływ związków na liczbę zagrzebanych kulek w teście zagrzebywania u myszy

Myszy umieszczano indywidualnie w klatkach, z 5 cm warstwą ściółki, w których ułożono 20 szklanych kulek (średnica 1,6 cm). Zliczano ilość zagrzebanych kulek po 30 minutach trwania testu. Związki badane i aripiprazol podawano dootrzewnowo (*i.p.*), 30 minut przed testem. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) lub 1,0 % Tween (*i.p.*) w przypadku aripiprazolu. Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, $n=8-10$ myszy na grupę. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA (Bonferroni *post hoc*) * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. odpowiednia grupa kontrolna

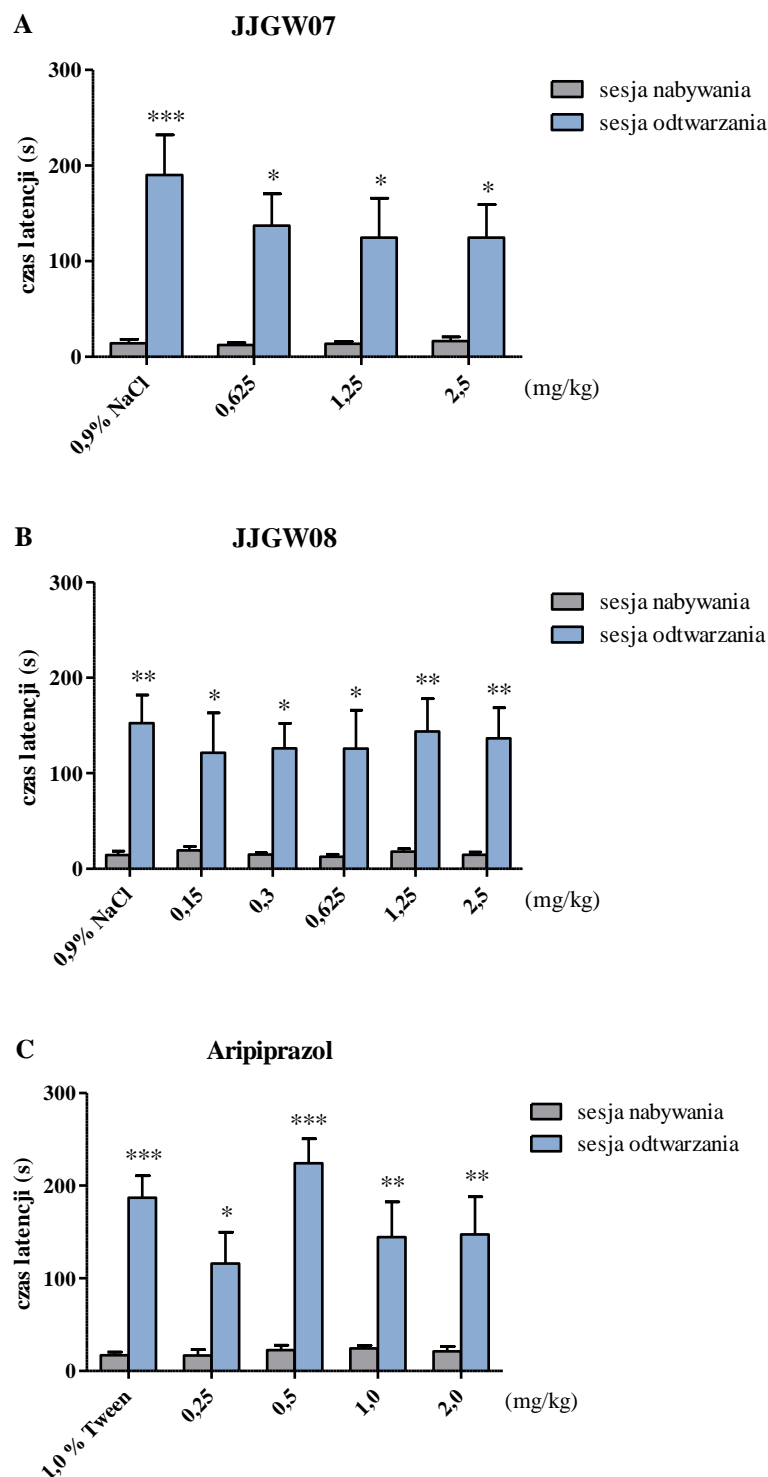
5.2.4 Wpływ na funkcje kognitywne w teście biernego unikania u myszy

Test wykonano dla związków JJGW07 i JJGW08 w dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie u myszy.

W sesji nabywania dla żadnej z dawek związku JJGW07 nie zaobserwowano istotnego wpływu na czas latencji w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 5.5.A). W sesji odtwarzania JJGW07, we wszystkich testowanych dawkach istotnie wydłużał czas latencji w porównaniu do sesji nabywania. Analiza wykazała istotny wpływ czasu na wyniki ($F(1,28)=46,040$, $p<0,001$), brak wpływu związku ($F(3,28)=0,681$, $p=0,571$) oraz brak interakcji ($F(3,28)=0,677$, $p=0,573$) (Ryc. 5.5.A).

Podobnie dla związku JJGW08, w sesji nabywania żadna z testowanych dawek nie wpływała istotnie na czas latencji w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 5.5.B). Badany związek we wszystkich testowanych dawkach istotnie wpływał na wydłużenie czasu latencji w sesji odtwarzania w porównaniu do sesji nabywania. Analiza wykazała istotny wpływ czasu na wyniki ($F(1,42)=74,300$, $p<0,001$), brak wpływu związku ($F(5,42)=0,115$, $p=0,988$) oraz brak interakcji ($F(5,42)=0,141$, $p=0,982$) (Ryc. 5.5.B).

Aripiprazol w zakresie dawek 0,25-2,0 mg/kg w sesji nabywania nie wpływał istotnie na czas latencji w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 5.5.C). Natomiast we wszystkich testowanych dawkach istotnie wydłużał czas latencji w sesji odtwarzania w porównaniu do sesji nabywania. Analiza wykazała istotny wpływ czasu na wyniki ($F(1,35)=91,760$, $p<0,001$), brak wpływu związku ($F(4,35)=1,627$, $p=0,189$) oraz brak interakcji ($F(4,35)=1,538$, $p=0,213$) (Ryc. 5.5.C).



Ryc. 5.5 Wpływ związków na czas latencji myszy w teście biernego unikania

W sesji nabywania myszy umieszczano indywidualnie w jasnej komorze aparatu, gdzie po 30 sekundach otwierały się drzwi do ciemniejszej komory. Po przejściu do ciemniejszej komory drzwi zamykały się, a zwierzę było karane wstrząsem elektrycznym (0,8 mA, 2 s). Związki badane i aripiprazol podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 30 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) lub 1,0 % Tween (*i.p.*) w przypadku aripiprazolu. Drugiego dnia testu myszy ponownie umieszczono w jasnej komorze i mierzono czas latencji przez maksymalnie 300 sekund (bez impulsu elektrycznego). Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, n=8 myszy na grupę. Analiza statystyczna: dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami (Bonferroni *post hoc*) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. sesja nabywania

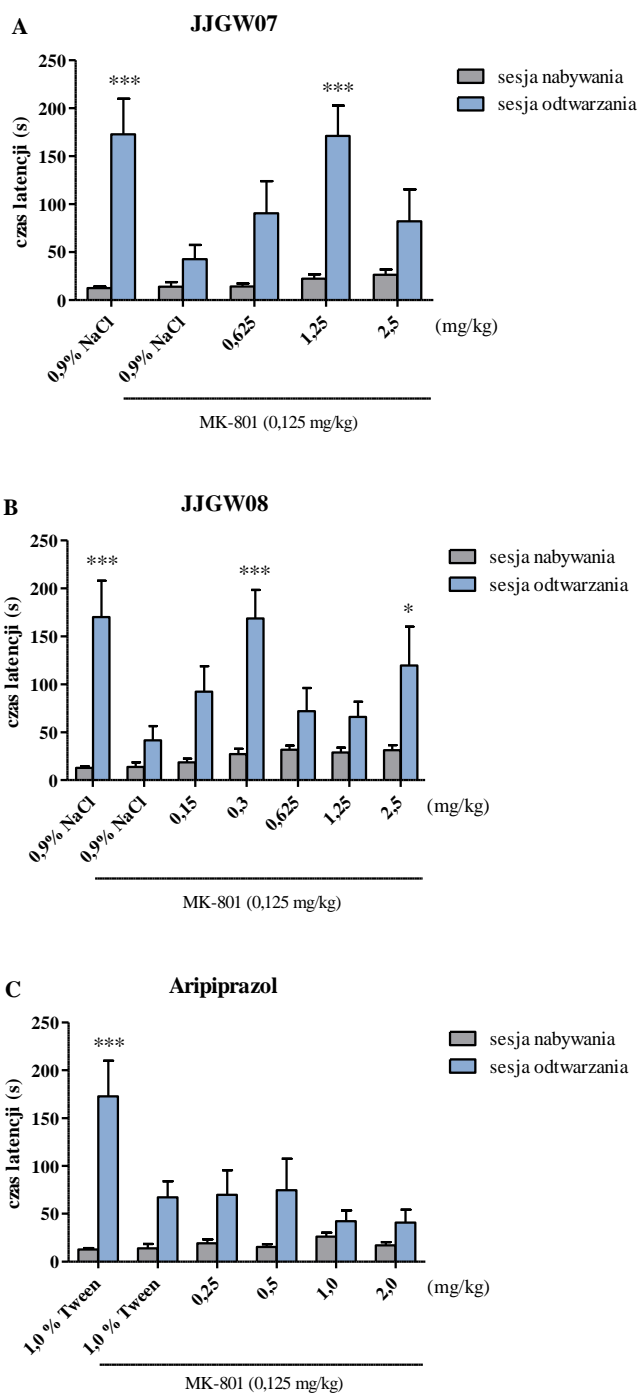
5.2.5 Wpływ na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście biernego unikania u myszy

Test przeprowadzono dla związków, które nie zaburzały pamięci we wcześniejszym eksperymencie.

W sesji nabywania żadna z dawek związku JJGW07 nie wpływała istotnie na czas latencji w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 5.6.A). Badany związek tylko w dawce 1,25 mg/kg odwracał zaburzenia pamięci indukowane podaniem MK-801 (0,125 mg/kg), istotnie wydłużając czas latencji w sesji odtwarzania w porównaniu do sesji nabywania (Ryc. 5.6.A). Analiza wykazała istotny wpływ czasu na wyniki ($F(1,35)=44,460$, $p<0,001$), a także istotny wpływ związku ($F(4,35)=3,531$, $p<0,05$) oraz występowanie interakcji ($F(4,35)=3,381$, $p<0,05$) (Ryc. 5.6.A).

Podobnie związek JJGW08 w sesji nabywania w żadnej z testowanych dawek nie wpływał istotnie na czas latencji w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 5.6.B). Badany związek odwracał zaburzenia pamięci indukowane podaniem MK-801 (0,125 mg/kg) w dawkach 0,3 oraz 2,5 mg/kg, istotnie wydłużając czas latencji w sesji odtwarzania w porównaniu do sesji nabywania (Ryc. 5.6.B). Analiza wykazała istotny wpływ czasu na wyniki ($F(1,49)=54,770$, $p<0,001$), a także istotny wpływ związku ($F(6,49)=3,100$, $p<0,05$) oraz występowanie interakcji ($F(6,49)=3,192$, $p<0,05$) (Ryc. 5.6.B).

Aripiprazol w zakresie dawek 0,25-2,0 mg/kg w sesji nabywania nie wpływał istotnie na czas latencji w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 5.6.C). W sesji odtwarzania w żadnej z testowanych dawek nie wydłużał czasu latencji w porównaniu do sesji nabywania i tym samym nie odwracał deficytów pamięci po podaniu MK-801 (0,125 mg/kg) (Ryc. 5.6.C). Analiza wykazała istotny wpływ czasu na wyniki ($F(1,42)=34,470$, $p<0,001$), a także istotny wpływ związku ($F(5,42)=3,353$, $p<0,05$) oraz występowanie interakcji ($F(5,42)=4,204$, $p<0,01$) (Ryc. 5.6.C).



Ryc. 5.6 Wpływ związków na czas latencji myszy w teście biernego unikania po podaniu MK-801

W sesji nabywania myszy umieszczano indywidualnie w jasnej komorze aparatu, gdzie po 30 sekundach otwierały się drzwi do ciemniejszej komory. Po przejściu do ciemniejszej komory drzwi zamykały się, a zwierzę było karane wstrząsem elektrycznym (0,8 mA, 2 s). Związki badane i aripiprazol podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 30 minut przed, natomiast MK-801 (0,125 mg/kg) podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 15 minut przed rozpoczęciem eksperymentu w celu wywołania zaburzeń pamięci. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) w dwóch iniekcjach (0,9% NaCl (*i.p.*) i 1,0% Tween (*i.p.*) w przypadku aripiprazolu) oraz 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) (lub 1,0% Tween (*i.p.*) w przypadku aripiprazolu) i MK-801 (0,125 mg/kg) (*i.p.*). Drugiego dnia testu myszy ponownie umieszczono w jasnej komorze i mierzono czas latencji przez maksymalnie 300 sekund (bez impulsu elektrycznego). Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, $n=8$ myszy na grupę. Analiza statystyczna: dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami (Bonferroni *post hoc*) * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. sesja nabywania

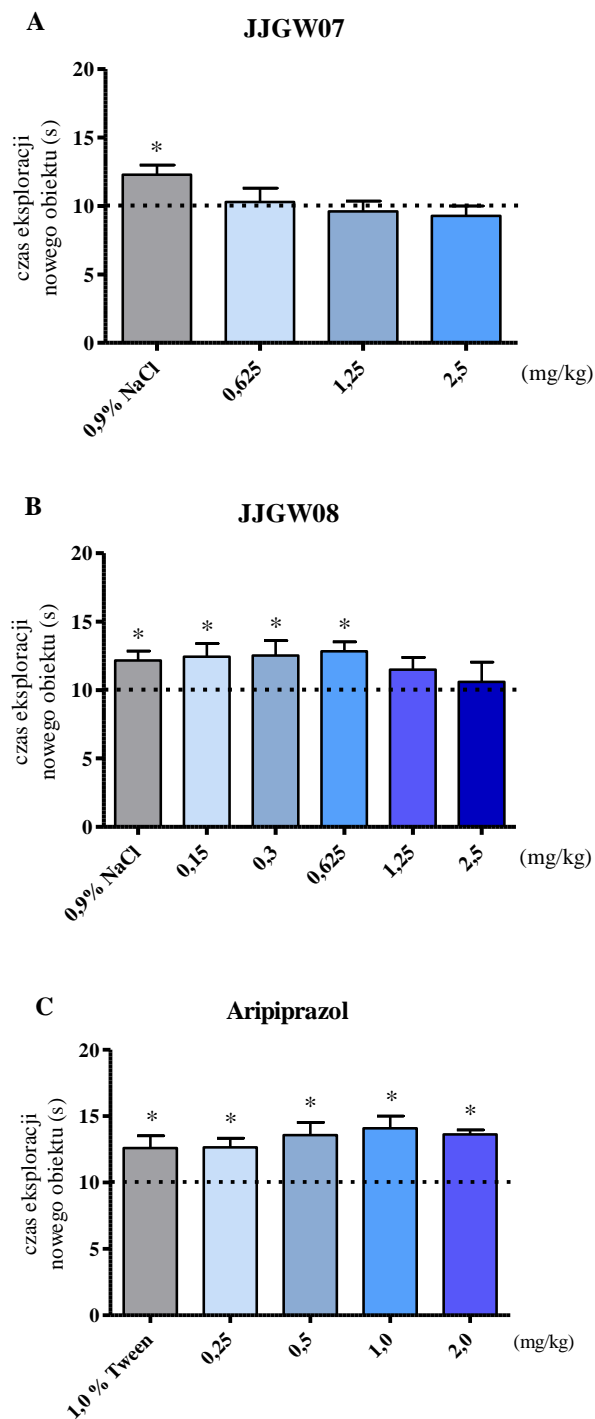
5.2.6 Wpływ na funkcje kognitywne w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy

Test wykonano dla związków JJGW07 i JJGW08 w dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie u myszy.

Spośród przebadanych związków tylko JJGW08 w dawkach 0,15, 0,3 i 0,625 mg/kg powodował, że czas eksploracji nowego obiektu był istotnie wyższy niż 10 sekund (Ryc. 5.7.B).

W przypadku związku JJGW07 w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg czas eksploracji nowego obiektu nie różnił się istotnie od 10 sekund (Ryc. 5.7.A).

Aripiprazol w zakresie dawek 0,25-2,0 mg/kg wywoływał istotne zwiększenie czasu eksploracji nowego obiektu powyżej 10 sekund (Ryc. 5.7.C).



Ryc. 5.7 Wpływ związków na czas eksploracji nowego obiektu u myszy w teście rozpoznawania nowego obiektu

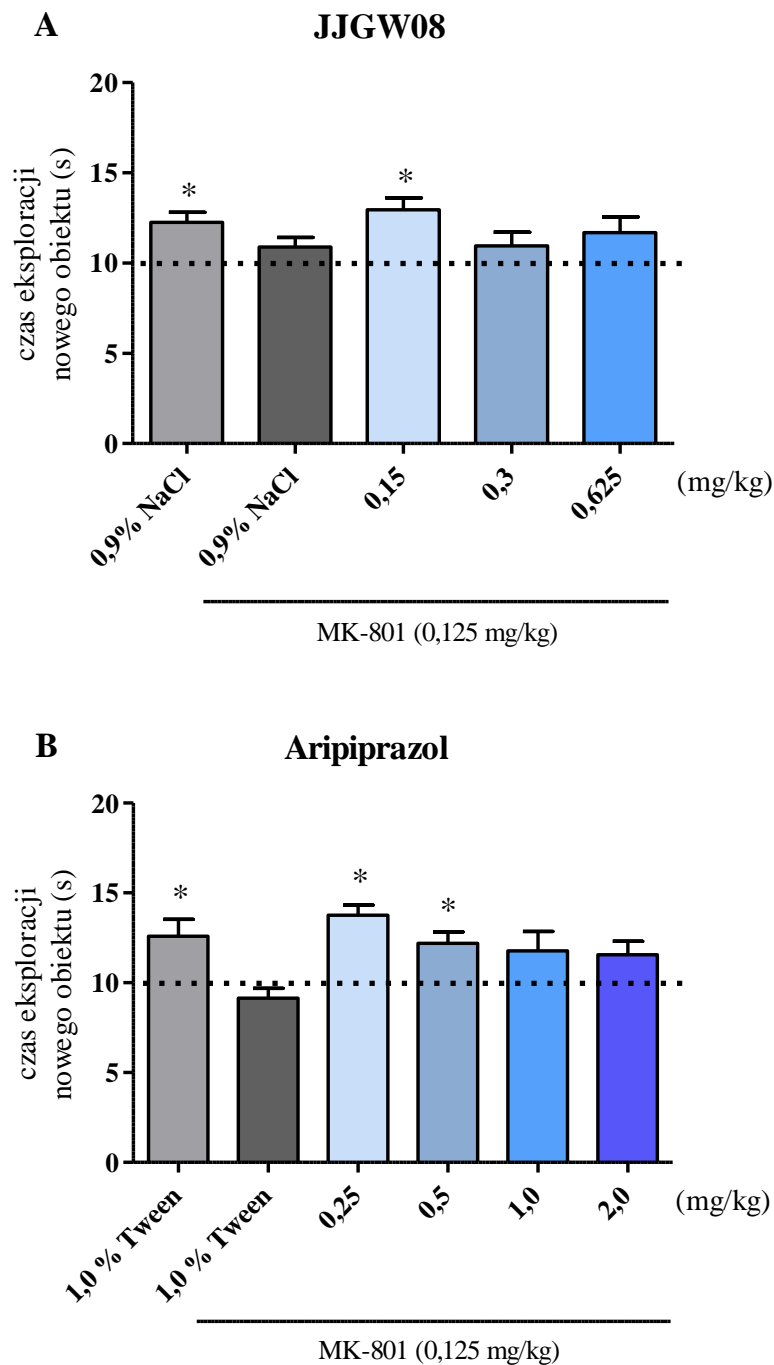
W pierwszym dniu testu myszy umieszczano i pozostawiono w klatkach do momentu, kiedy osiągnęły łączny czas eksploracji obu identycznych obiektów równy 20 sekund, ale nie dłużej niż 10 minut. Związki badane i aripiprazol podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 30 minut przed rozpoczęciem eksperymentu. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) lub 1,0% Tween w przypadku aripiprazolu. Drugiego dnia testu myszy ponownie umieszczono w klatkach, ale tym razem jeden obiekt zmieniono na nowy. Myszy pozostawały w klatce do momentu osiągnięcia łącznego czasu eksploracji równego 20 sekund, ale nie dłużej niż 10 minut. W tej sesji mierzono czas eksploracji nowego obiektu. Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, $n=8-10$ myszy na grupę. Analiza statystyczna: test t-Studenta dla jednej próby $*p<0.05$ vs. wartość testowana=10

5.2.7 Wpływ na zdolność odwracania deficytów pamięciowych wywołanych podaniem MK-801 w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy

Test przeprowadzono dla związku, który nie zaburzał pamięci we wcześniejszym eksperymencie.

JJGW08 tylko w najniższej dawce 0,15 mg/kg odwracał zaburzenia pamięci wywołane przez MK-801 (0,125 mg/kg) i powodował, że czas eksploracji nowego obiektu był istotnie wyższy niż 10 sekund. W pozostałych dawkach (0,3 i 0,625 mg/kg) dla badanego związku nie zaobserwowano podobnego efektu i czas eksploracji nowego obiektu nie różnił się istotnie od 10 sekund (Ryc. 5.8.A).

Aripiprazol w dawkach 0,25 i 0,5 mg/kg wywoływał istotne zwiększenie czasu eksploracji nowego obiektu powyżej 10 sekund. W pozostałych dawkach nie zaobserwowano takiego efektu (Ryc. 5.8.B).



Ryc. 5.8 Wpływ związków na czas eksploracji nowego obiektu u myszy w teście rozpoznawania nowego obiektu po podaniu MK-801

W pierwszym dniu testu myszy umieszczano i pozostawiono w klatkach do momentu, kiedy osiągnęły łączny czas eksploracji obu identycznych obiektów równy 20 sekund, ale nie dłużej niż 10 minut. Związek badany i aripiprazol podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 30 minut przed, natomiast MK-801 (0,125 mg/kg) podawano dootrzewnowo (*i.p.*) 15 minut przed rozpoczęciem eksperymentu w celu wywołania zaburzeń pamięci. Grupa kontrolna otrzymała 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) w dwóch iniekcjach (0,9% NaCl (*i.p.*) i 1,0% Tween (*i.p.*) w przypadku aripiprazolu) oraz 0,9% roztwór NaCl (*i.p.*) (lub 1,0% Tween (*i.p.*) w przypadku aripiprazolu) i MK-801 (0,125 mg/kg) (*i.p.*). Drugiego dnia testu myszy ponownie umieszczono w klatkach, ale tym razem jeden obiekt zmieniono na nowy. Myszy pozostawały w klatce do momentu osiągnięcia łącznego czasu eksploracji równego 20 sekund, ale nie dłużej niż 10 minut. W tej sesji mierzono czas eksploracji nowego obiektu. Wartości wyrażono jako średnie \pm SEM, $n=8-10$ myszy na grupę. Analiza statystyczna: test t-Studenta dla jednej próby $*p<0.05$ vs. wartość testowana=10

6 Dyskusja

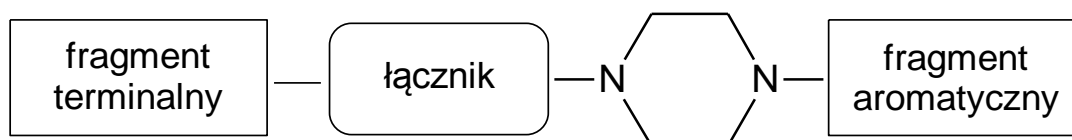
Schizofrenia nie bez powodu uznawana jest za jedno z najcięższych zaburzeń psychicznych współczesnego społeczeństwa. Obecnie szacuje się, że stanowi 0,5% całkowitego wskaźnika DALY (ang. *disability adjusted life-years*), a więc lat życia skorygowanych niepełnosprawnością w społeczeństwie [240]. Nieustannie rosnąca zachorowalność na zaburzenia psychiczne związana jest z wieloma czynnikami, nie tylko socjoekonomicznymi ale także: szybkim tempem życia, postępującym starzeniem się populacji ludzkiej, zwiększoną wykrywalnością chorób oraz coraz lepszą świadomością pacjentów i lekarzy. Przewlekły charakter schizofrenii charakteryzuje się okresami zaostrzeń objawów, przeplatanych częściową lub niemal całkowitą remisją. Pomimo dostępnego leczenia, jedynie u około 13,5% chorych obserwuje się poprawę [241], a niestety aż u około 70-80% pacjentów nie osiąga się efektów terapii [242]. Największym problemem pozostają wciąż objawy negatywne oraz zaburzenia poznawcze, które znacznie utrudniają pacjentom funkcjonowanie w codziennym życiu, prowadząc do izolacji społecznej i całkowitej destrukcji życia prywatnego. Dodatkowo, schorzenia współtowarzyszące schizofrenii, takie jak depresja i stany lękowe wpływają niekorzystnie na zaostrzenie objawów choroby i w znacznym stopniu utrudniają skuteczną terapię. Dlatego, tak ważne jest ciągle poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych i bezpiecznych leków przeciwpsychotycznych, o wielokierunkowym mechanizmie działania, które w znacznym stopniu będą zwalczały objawy negatywne choroby oraz schorzenia współtowarzyszące, takie jak: zaburzenia kognitywne oraz stany depresyjne i lękowe.

Badane związki

Przedmiotem badań niniejszej pracy była grupa nowych ośmiu arylopiperazynoalkilowych pochodnych salicylamidu o potencjalnej aktywności ośrodkowej, które przebadano pod kątem potencjalnych właściwości przeciwpsychotycznych, przeciwdepresyjnych i przeciwłękowych oraz określono ich wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Badania poszerzono dla dwóch wybranych pochodnych, określając między innymi ich potencjalne właściwości prokognitywne. Zaprojektowanie i synteza nowych struktur chemicznych, jako potencjalnych

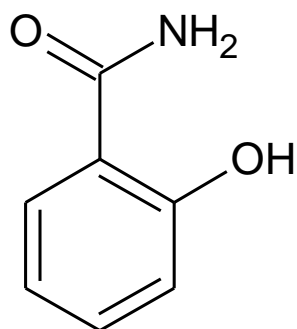
kandydatów na leki w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego, była możliwa dzięki badaniom prowadzonym w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Kołaczekowskiego, we współpracy z Wydziałem Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej.

Badane związki strukturalnie należą do grupy tzw. długołańcuchowych arylopiiperazyn (ang. *Long-Chain Arylpiperazines*, LCAPs), które charakteryzuje określona budowa chemiczna (Ryc. 6.1). W strukturze LCAPs wyróżnia się trzy główne elementy: grupę arylopiiperazyny, łącznik oraz fragment terminalny. W części aromatycznej najbardziej rozpowszechniona jest jedno-, dwu- lub trójpodstawiona grupa fenyłowa. Fragmenty łączące (tzw. linkery) mogą mieć od jednego do sześciu członów i zawierać heteroatomy, przy czym najczęściej występują tutaj łańcuchy trzy- lub czterowęglowe. Natomiast fragment terminalny, może przyjmować formę różnorodnych jedno- lub wielopięściennych układów aromatycznych lub acyklicznych, często zawierających ugrupowania amidowe lub laktamowe.



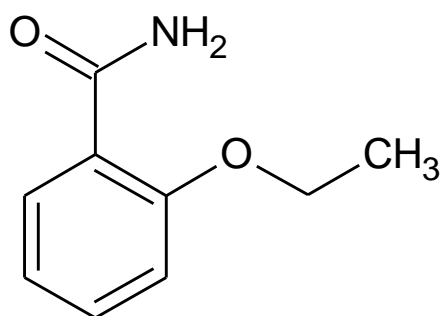
Ryc. 6.1 Wzór ogólny długołańcuchowych pochodnych arylopiiperazyny

W badanych związkach rolę fragmentu terminalnego pełni układ salicylamidu, podstawiony przez atom tlenu. Sam salicylamid (Ryc. 6.2) jest związkiem o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym. Jako niesteroidowy lek przeciwzapalny, działa poprzez blokowanie syntezy prostaglandyn na skutek hamowania cyklooksygenazy kwasu arachidonowego [16].



Ryc. 6.2 Struktura salicylamidu

Ze względu na swoje właściwości do dzisiaj stosowany jest w preparatach złożonych o powyższym profilu działania. Podobnie jego etylowa pochodna eterowa, etenzamid (Ryc.6.3), który wchodzi w skład preparatu złożonego o działaniu przeciwbólowym.



Ryc. 6.3 Struktura etenzamidu

Obecność układu salicylamidu, jako fragmentu terminalnego w nowo zsyntetyzowanych związkach, nie wnosi aktywności przeciwzapalnej, natomiast ma wpływ na ich powinowactwo receptorowe i profil funkcjonalny, szczególnie wobec receptorów dopaminergicznych D_2 oraz serotoninergetycznych $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$ i $5-HT_7$.

Wiele dostępnych obecnie leków należy do długołańcuchowych pochodnych arylopiiperazyny, w tym głównie leki stosowane w schorzeniach neuropsychiatrycznych: schizofrenii, chorobie afektywnej dwubiegunowej, depresji czy lęku. Wyróżniamy tutaj między innymi: aripiprazol, karpiprazynę i brekspiprazol o działaniu przeciwpyszotycznym, wilazodon i trazodon o aktywności przeciwdepresyjnej, a także przeciwlękowy buspiron [16]. Aripiprazol, poza leczeniem schizofrenii, stosowany jest również w terapii epizodów manii w chorobie afektywnej dwubiegunowej oraz jako lek

wspomagający w terapii depresji [243,244]. Podobnie brekspiprazol, który może być stosowany jako adiuwant w leczeniu depresji oraz karpiprazyna skuteczna w przypadku ostrych lub mieszanych epizodów maniakalnych w chorobie afektywnej dwubiegunowej [105,106]. Dostępna literatura wskazuje jednoznacznie na szerokie spektrum właściwości pochodnych arylopiiperazynowych i ich udokumentowane działanie przeciwpsychotyczne [245,246], przeciwdepresyjne i przeciwłękowe [247–255], a także hipotensyjne [256–259]. Ich złożona aktywność farmakologiczna wynikać może przede wszystkim z istotnego powinowactwa do receptorów serotoninerdycznych [253,260–264], dopaminergicznych [246,265,266] oraz adrenergicznych [267–269].

Wśród badanych związków, trzy pochodne tj.: JJGW01, JJGW02 i JJGW03 zawierają ugrupowanie 3-chlorofenylopiiperazyny, a pozostałe pięć pochodnych (JJGW07, JJGW08, JJGW09, JJGW11 i JJGW12) zawierają ugrupowanie 2-metoksyfenylopiiperazyny, charakterystyczne dla wielu związków o działaniu α_1 -adrenolitycznym.

Ugrupowanie arylopiiperazynowe testowanych pochodnych połączone jest z grupą fenolową salicylamidu za pośrednictwem łącznika alifatycznego, bądź alifatyczno-aromatycznego, co dodatkowo różnicuje ich właściwości. Dla związków JJGW01 i JJGW07 łącznikiem jest grupa butylowa, dla JJGW02 i JJGW08 grupa pentyłowa, dla JJGW03 i JJGW09 grupa heksylowa, a dla związków JJGW11 i JJGW12 grupa 3-metylofenylometylowa.

Biorąc pod uwagę budowę chemiczną nowych pochodnych, a w szczególności ich ugrupowanie arylopiiperazynowe, w pierwszym etapie badań *in vitro* oceniono powinowactwo związków do receptorów dopaminergicznych D_2 , serotoninerdycznych $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$, $5-HT_6$ i $5-HT_7$ oraz adrenergicznych α_1 i α_2 , a także wykonano testy oceniające aktywność funkcjonalną związków.

Badania in vitro

Wszystkie badane pochodne wykazały istotne powinowactwo do receptora dopaminergicznego D_2 , z czego najsilniej wiązały się: **JJGW02, JJGW08, JJGW09 i JJGW12** (wartości K_i poniżej 30 nM), nieco słabiej: JJGW03 ($K_i=37,0$ nM) i JJGW11 ($K_i=37,6$ nM), a najsłabiej: JJGW01 ($K_i=150,0$ nM) oraz JJGW07 ($K_i=138,5$ nM). Można zaobserwować, że grupa butylowa podstawiona w położeniu 4 pierścienia piiperazyny (JJGW01 i JJGW07), wyraźnie zmniejszyła, a grupa pentyłowa (JJGW02

i JGW08) zwiększyła powinowactwo związków względem receptorów dopaminergicznych D_2 . W badaniach funkcjonalnych, pochodne 3-chlorofenylopiiperazyny: **JGW01**, **JGW02** i **JGW03** odnotowały istotne właściwości agonistyczne względem receptora dopaminergicznego D_2 . Pozostałe pochodne 2-metoksyfenylopiiperazyny, wykazały cechy antagonistów badanych receptorów (wartości K_b w granicach 2,4-430,0 nM), gdzie najsilniejsze były: **JGW08** ($K_b=2,4$ nM) oraz **JGW07** ($K_b=18,0$ nM). Dane literaturowe wskazują, że związki modulujące aktywność receptorów dopaminergicznych D_2 posiadają potencjalne właściwości przeciwpsychotyczne, czy też przeciwdepresyjne [270,271], co pozwala przewidywać podobną aktywność wśród testowanych pochodnych.

Wszystkie badane związki wykazały także wysokie powinowactwo względem receptorów serotonergicznych $5-HT_{1A}$ ($K_i \leq 20$ nM), a najsilniej wiązały się: **JGW02**, **JGW03** i **JGW09** z wartościami K_i w granicach 0,6-1,2 nM. Najwyższe powinowactwo, wyższe niż substancji odniesienia - serotoniny, zaobserwowano dla JGW09, będącej pochodną 2-metoksyfenylopiiperazyny [272–274]. W przypadku pozostałych pięciu związków, można zauważyć, że obecność ugrupowania butylowego oraz metylofenylometylowego w pozycji 4 piperazyny nieznacznie wpłynęła na zmniejszenie badanego powinowactwa. W badaniach funkcjonalnych wszystkie testowane pochodne, za wyjątkiem częściowego agonisty JGW03, wykazały właściwości antagonistów receptora serotonergicznego $5-HT_{1A}$, a najsilniejsze były związki: **JGW02**, **JGW08** i **JGW09** (wartości K_b w granicach 0,28-0,34 nM), co koreluje z wynikami powinowactwa receptorowego. Pozostałe cztery pochodne charakteryzowały się słabszą aktywnością antagonistyczną, a ich wartości K_b oscylowały w granicach: 2,9-4,5 nM. Bazując na dostępnej literaturze, opisującej wielu antagonistów, a także częściowych agonistów receptora serotonergicznego $5-HT_{1A}$, jako związki o silnej aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej [271,275], a także potencjalnych właściwościach prokognitywnych [238,276–283], można przypuszczać, że badane pochodne wykażą podobny profil aktywności w badaniach *in vivo*.

Wśród badanych związków najwyższe powinowactwo względem receptora $5-HT_{2A}$ wykazały pochodne 3-fenylopiiperazyny: **JGW01**, **JGW02** i **JGW03**, osiągając wartości K_i poniżej 30 nM, z czego najsilniej wiązał się: JGW01 ($K_i=3,7$ nM), a pozostałe pięć pochodnych 2-metoksyfenylopiiperazyny zademonstrowało słabsze powinowactwo (K_i w granicach 114,0-235,0 nM). W badaniach funkcjonalnych

związki: **JJGW02, JJGW07, JJGW08 i JJGW09** ujawniły słabe właściwości częściowych agonistów receptora serotonergicznego 5-HT_{2A}. Pozostałe pochodne, za wyjątkiem JJGW12, to słabi antagoniści tych receptorów, przy czym najsilniejsze okazały się pochodne 3-chlorofenylopiperazyny: **JJGW01 i JJGW03** (wartości K_b pomiędzy: 54,0-80,0 nM), a znacznie słabszy: JJGW11 (K_b=830,0 nM). Antagoniści oraz częściowi agoniści receptora serotonergicznego 5-HT_{2A} to udokumentowane związki o aktywności przeciwpsychotycznej i przeciwdepresyjnej [271,284], stąd można zakładać takie działanie wśród testowanych, nowych pochodnych.

Wszystkie testowane związki wykazały także powinowactwo do receptora serotonergicznego 5-HT₇, z czego najsilniejsze wiązanie zaobserwowano dla: **JJGW02, JJGW03, JJGW11 i JJGW12**, z wartościami K_i poniżej 30 nM. Pozostałe cztery badane pochodne wiązały się z receptorem w sposób umiarkowany (K_i w granicach 30,0-85,8 nM). Można zatem stwierdzić, że obecność układu metylofenylometylowego w analizowanych cząsteczkach zwiększa powinowactwo do badanych receptorów 5-HT₇. W badaniach funkcjonalnych wszystkie testowane pochodne wykazały bardzo słabe właściwości antagonistyczne względem receptorów serotonergicznym 5-HT₇ (wartości K_b w granicach: 89,0-1600,0 nM), a najsilniejszy był związek: **JJGW01**. Antagoniści receptora serotonergicznego 5-HT₇ są coraz szerzej badaną grupą związków, o udowodnionym działaniu przeciwdepresyjnym i przeciwlękowym [215,271,275,285,286], a także potencjalnych właściwościach przeciwpsychotycznych [287,288] i prokognitywnych [281,283,289], co wskazuje, że badane pochodne mogą wykazać podobne efekty działania w prowadzonych eksperymentach.

Wszystkie badane związki wykazały także powinowactwo do receptora adrenergicznego α₁, osiągając wartości K_i poniżej 40 nM. Najsilniejsze powinowactwo, silniejsze od związku odniesienia – fentolaminy, zaobserwowano dla pochodnych: **JJGW01, JJGW02, JJGW03, JJGW08, JJGW09 i JJGW11**, dla których wartości K_i wahały się w granicach: 4,0-8,5 nM, a słabsze dla związków: JJGW07 (K_i=14,0 nM) i JJGW12 (K_i=39,0 nM). Uzyskane wyniki potwierdzają, że pochodne 2-metoksyfenylopiperazyny charakteryzują się wysokim powinowactwem do receptorów adrenergicznych α₁ [260,267,290], co może odpowiadać za aktywność krążeniową, w tym potencjalne właściwości hipotensyjne [291–294].

Pozostałe wyniki pokazują, że testowane związki nie posiadają istotnego powinowactwa do receptorów serotonergicznym 5-HT₆ oraz adrenergicznych α₂.

Badania in vivo

Na podstawie uzyskanego profilu receptorowego i aktywności funkcjonalnej testowanych związków, przeprowadzono szereg badań behawioralnych, mających na celu przede wszystkim określić ich potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną, przeciwdepresyjną i przeciwłękową, a także wpływ na koordynację ruchową, aktywność lokomotoryczną oraz ewentualne właściwości kataleptogenne. Dodatkowo, w ramach farmakologii bezpieczeństwa, wykonano również analizę wpływu związków na układ sercowo-naczyniowy, w tym: wpływ na ciśnienie tętnicze, presyjne działanie metoksaminy oraz prawidłowy elektrokardiogram u szczurów.

Pierwszym z przeprowadzonych testów skriningowych był test hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 u myszy, który służy do oceny potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej. MK-801, blokuje receptor NMDA w sposób niekompetycyjny i poprzez stymulację aktywności większości neuronów dopaminergicznym w obszarze mezolimbicznym, w obrębie jądra brzusznej nakrywki zwiększa uwalnianie dopaminy w rejonach docelowych, tj.: w prążkowie, przyśrodkowej korze przedczołowej i w jądrze półleżącym [295–297]. Obok fencyklidyny i ketaminy, innych powszechnie znanych antagonistów receptora NMDA, MK-801 wywołuje u gryzoni złożony zespół behawioralny (obejmujący m.in.: hiperlokomocję, krążenie w kółko, deficyty bramkowania sensomotorycznego, wycofanie społeczne, czy też kołysanie głową [298]), naśladując zarówno objawy pozytywne jak i negatywne schizofrenii i równocześnie odzwierciedlając głównie glutaminergiczne aspekty choroby [299–301]. Jego podanie imituje u zwierząt stan psychotyczny, objawiający się nadmierną ruchliwością [302], a zdolność do odwrócenia wywołanej hiperlokomocji, świadczy o potencjalnych właściwościach przeciwpsychotycznych i związana jest prawdopodobnie z silnym antagonizmem receptorów serotonergicznym 5-HT_{2A} [303]. Badania wskazują, że nadmierna ruchliwość zwierząt po MK-801, a także deficyty bramkowania czuciowo-ruchowego [304,305] mogą być antagonizowane przez leki przeciwpsychotyczne, szczególnie neuroleptyki drugiej generacji [298,306].

Za wyjątkiem związków JJGW11 i JJGW12, wszystkie badane pochodne wykazały aktywność w przeprowadzonym teście hiperlokomocji, z czego najsilniejsze działanie przeciwpsychotyczne posiadał związek: **JJGW08** (najsilniejszy antagonist receptoru dopaminergicznego D₂ i częściowy agonista receptora serotonergicznego

5-HT_{2A}), zmniejszając nadmierną ruchliwość zwierząt w dawce 0,15 mg/kg. Nieco słabiej, w dawce 0,625 mg/kg, działały związki: **JJGW01**, **JJGW02** i **JJGW07**, a najsłabszą aktywność wykazały pochodne: JJGW09 i JJGW03, działając w dawkach odpowiednio 1,25 i 2,5 mg/kg.

Drugi z eksperymentów, czyli test hiperlokomocji indukowanej podaniem amfetaminy u myszy, podobnie umożliwia poszukiwanie potencjalnych leków przeciwpsychotycznych. Psychoza stymulująca wywoływana przez d-amfetaminę, jedną z najbardziej znanych substancji psychoaktywnych, charakteryzuje się przede wszystkim występowaniem paranoicznych urojeń, zróżnicowanych halucynacji (najczęściej czuciowych) oraz stereotypii [307]. W modelach zwierzęcych schizofrenii podanie amfetaminy imituje stan psychotyczny, objawiający się nadmierną ruchliwością zwierząt, poprzez zwiększenie transmisji dopaminergicznej i noradrenergicznej w ośrodkowym układzie nerwowym [308]. Szczegółne zwraca się uwagę na wzrost poziomu dopaminy w prążkowie brzuszny w szlaku mezolimbicznym, co odzwierciedla mechanizmy neuronalne związane z objawami pozytywnymi schizofrenii [309–311]. Zmniejszenie wywołanej hiperlokomocji, sugeruje potencjalne właściwości przeciwpsychotyczne, związane z silną blokadą receptorów dopaminergicznych D₂.

Wszystkie badane związki, za wyjątkiem JJGW11 i JJGW12, wykazały aktywność w przeprowadzonym teście, z czego najsilniejszą potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną wykazał związek: **JJGW08** (silny antagonist receptorów dopaminergicznych D₂), skuteczny w dawce 0,3 mg/kg. Istotne działanie, w dawce 0,625 mg/kg, zademonstrował również związek: **JJGW02**, a nieco słabiej działały pochodne: JJGW01 i JJGW09 (dawka aktywna 1,25 mg/kg) oraz JJGW03 i JJGW07 (dawka aktywna 2,5 mg/kg). Warto podkreślić, że najbardziej aktywne w tym teście związki: JJGW02 i JJGW08 posiadają wysokie powinowactwo do receptorów dopaminergicznych D₂, co bezwzględnie koreluje z założeniami eksperymentu.

W przypadku obu opisanych powyżej testów jako substancję odniesienia wykorzystano olanzapinę, atypowy neuroleptyk, będący jednym z powszechnie stosowanych leków przeciwpsychotycznych.

W kolejnym kroku przeprowadzono test wymuszonego pływania u myszy, służący do oceny potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej badanych związków. Eksperyment charakteryzuje się wysoką czułością, nawet dla atypowych, nieaktywnych w innych testach środków przeciwdepresyjnych [312], dlatego na szeroką skalę stosowany jest on przy poszukiwaniu leków przeciwdepresyjnych. Co więcej,

przeprowadzając go u myszy, obserwuje się mniej fałszywie negatywnych wyników, a u szczurów mniej fałszywie pozytywnych rezultatów, osiągając znacznie wyższą selektywność [313]. Zmniejszenie czasu bezruchu zwierząt w teście, świadczy o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej.

Niestety żaden spośród badanych związków nie wykazał aktywności w przeprowadzonym teście i nie wpływał na obniżenie czasu bezruchu zwierząt. Badane pochodne, za wyjątkiem związku JJGW08, nie wpływały również na czas pływania oraz czas wspinania myszy. Związek JJGW08 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg wykazał natomiast odwrotny efekt, powodując zwiększenie czasu bezruchu zwierząt oraz zmniejszenie ich czasu pływania, co może wynikać z jego ewentualnych właściwości sedatywnych w wyższych dawkach. Brak przewidywanej aktywności przeciwdepresyjnej w teście wymuszonego pływania wśród badanych, nowych antagonistów receptorów serotonergicznym 5-HT_{1A} pokazuje, że nie zawsze aktywność receptorowa koreluje ze spodziewanymi efektami działania w testach *in vivo*.

Drugim przeprowadzonym testem, oceniającym potencjalne właściwości przeciwdepresyjne związków, był test zawieszania za ogon u myszy. Należy podkreślić, że nie wszystkie substancje o właściwościach przeciwdepresyjnych ujawnią aktywność w tym teście [314], jednak w porównaniu z testem wymuszonego pływania, posiada on wyższą tzw. *predictive validity*, a więc zdolność do odzwierciedlania skuteczności badanej substancji z modelu zwierzęcego na ludzi [315]. Podobnie jak opisywano powyżej, potencjalną aktywność przeciwdepresyjną w tym teście warunkuje istotne obniżenie czasu bezruchu zwierząt.

Wśród badanych pochodnych zmniejszenie czasu bezruchu zaobserwowano dla związków: **JJGW01**, **JJGW03**, **JJGW07** i **JJGW09**, które działały już w dawce 0,15 mg/kg. Pozostałe związki nie były aktywne w teście. Co ważne, związek: JJGW08 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg oraz JJGW09 w dawce 2,5 mg/kg istotnie wpływały na zwiększenie czasu bezruchu zwierząt w teście, co prawdopodobnie może wynikać z ich właściwości sedatywnych w wyższych dawkach.

Różnice w wynikach otrzymanych z przeprowadzonych powyżej testów i brak aktywności przeciwdepresyjnej w teście wymuszonego pływania u myszy, mogą wynikać z charakteru eksperymentów. Test zawieszania za ogon jest bowiem bardziej czuły wobec wykrywania działania przeciwdepresyjnego, gdyż czas obserwacji zwierzęcia jest dłuższy niż w teście wymuszonego pływania. Co więcej, test Porsolta

ma pewne ograniczenia dotyczące zachowania zwierząt, ponieważ bezruch zwierzęcia może być spowodowany samym szokiem po umieszczeniu w wodzie [316]. Najbardziej miarodajne wyniki byłyby możliwe w przypadku oceny aktywności związków w modelu depresji (np. nieprzewidywalnego chronicznego stresu), który w odróżnieniu od opisanych powyżej eksperymentów ostrych, odzwierciedla zarówno zmiany behawioralne jak i neurochemiczne obserwowane u osób chorujących na depresję [317,318].

Ze względu na fakt, że opisane powyżej testy miały charakter skringingowy i badano nowe struktury o nieznannej aktywności, jako substancje odniesienia wykorzystano w nich leki przeciwdepresyjne, a nie substancje przeciwpsychotyczne o aktywności przeciwdepresyjnej. W przypadku testu wymuszonego pływania użyto mianserynę, lek o zbliżonym profilu receptorowym do badanych związków, wliczając receptory adrenergiczne α_1 oraz serotonergiczne 5-HT_{2A} i 5-HT₇, natomiast w teście zawieszania za ogon wykorzystano moklobemid, selektywny, odwracalny inhibitor monoaminoooksydazy typu A, a więc dwa silnie działające leki przeciwdepresyjne, o udokumentowanej aktywności w testach behawioralnych [280,319–321].

W następnym kroku postanowiono zweryfikować potencjalne właściwości przeciwlękowe badanych związków. Liczne doniesienia naukowe opisują bowiem taką aktywność wśród pochodnych fenylopiperyminy [322–325]. W pierwszej kolejności przeprowadzono test czterech płytek u myszy, który jest jednym z podstawowych testów służących do oceny właściwości anksjolitycznych, opierającym się na tzw. sytuacji konfliktowej. Naturalny odruch zwierząt do ruchliwości eksploracyjnej w nowym otoczeniu hamowany jest tutaj za pośrednictwem nieuszkodzającego bodźca awersyjnego, a mianowicie słabego impulsu elektrycznego. Blokowanie tłumiącego działania bodźca i zwiększenie ilości przejść zwierząt karanych impulsem elektrycznym, świadczy o potencjalnym działaniu przeciwlękowym.

Spośród przebadanych pochodnych aktywność w teście czterech płytek wykazały związki: **JJGW01, JJGW07, JJGW08 i JJGW09**, z czego najsilniej działał: JJGW08, zwiększając ilość przejść zwierząt karanych impulsem elektrycznym w dawce 0,3 mg/kg. Pozostałe pochodne nie były aktywne w przeprowadzonym teście.

Drugim wykonanym testem oceniającym właściwości anksjolityczne, był test uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy. Określa się go, jako test neofobowy, pozwalający badać zachowanie zwierząt w nowym otoczeniu, np. w silnie oświetlonym pomieszczeniu. Naturalną, spontaniczną reakcją zwierząt jest unikanie wchodzenia

w otwarte, oświetlone ramiona labiryntu, natomiast jeśli związek posiada właściwości przeciwlękowe, powoduje zwiększenie czasu przebywania zwierząt w ramionach otwartych.

Żaden spośród badanych związków nie wykazał aktywności w teście uniesionego labiryntu krzyżowego i nie wpływał istotnie na zwiększenie czasu przebywania w ramionach otwartych. Warto zauważyć, że związki: JJGW02, JJGW07, JJGW08 i JJGW09 powodowały istotne zmniejszenie ilości wejść zwierząt do ramion otwartych, co może świadczyć o ich ewentualnych właściwościach sedatywnych.

Uzyskane wyniki i brak efektów działania przeciwlękowego w teście uniesionego labiryntu krzyżowego mogą wynikać z odmiennej aktywności badanych związków wobec różnego rodzaju zaburzeń lękowych (zróżnicowane podłoże neurobiologiczne lęku, różne objawy i bodźce wywołujące niepokój) [326]. Test czterech płytek bowiem, bada uwarunkowaną reakcję zwierzęcia na stresującą sytuację, konkretnie tłumienie eksploracji nowego otoczenia przez łagodny, nieuszkodzający impuls elektryczny i najczęściej pozwala wyjaśniać mechanizmy działania przeciwlękowego wśród agonistów lub antagonistów receptorów serotoninowych [327]. Test uniesionego labiryntu krzyżowego natomiast, opiera się na ogólnej reakcji unikania i naturalnej niechęci gryzoni do otwartych przestrzeni, odnosząc się najczęściej do podłoża lęku uogólnionego, fobii i stresu pourazowego [328]. Co więcej, w literaturze obserwuje się często przeciwstawne efekty działania przeciwlękowego wśród ligandów receptorów serotonergiczných, co wynika prawdopodobnie z działania serotoniny i jej złożonego wpływu na różne typy lęku w modelach zwierzęcych [326].

Przeprowadzone powyżej testy czterech płytek oraz uniesionego labiryntu krzyżowego miały charakter przesiewowy, stąd jako substancję odniesienia wykorzystano lek anksjolityczny - diazepam, a nie substancję przeciwpsychotyczną o dodatkowej aktywności przeciwlękowej.

W następnym etapie niezbędne było określenie wpływu testowanych związków na aktywność lokomotoryczną zwierząt w przeprowadzonych testach behawioralnych. Wykluczenie działania psychostymulującego jest konieczne, ponieważ wiele substancji psychoaktywnych (np. kofeina, amfetamina) może wykazywać fałszywie pozytywną aktywność w testach behawioralnych, zwiększając ruchliwość zwierząt. Działanie sedatywne natomiast, utożsamiane ze zmniejszeniem aktywności spontanicznej zwierząt [329,330], może w pewnym stopniu być pożądane podczas terapii chorób psychicznych, takich jak schizofrenia, depresja czy lęk, szczególnie w przypadku

towarzyszącej bezsenności. Niestety, najczęściej jednak nadmierna sedacja jest niekorzystnym działaniem niepożądanym, utrudniającym właściwe leczenie pacjentów.

Badane związki nie wpływały istotnie na ruchliwość spontaniczną zwierząt podczas 60-minutowej sesji odpowiadającej testom hiperlokomocji, stąd można stwierdzić, że uzyskane w tych testach wyniki są specyficzne.

Podczas 4- i 6-minutowej sesji, odpowiednio dla testu wymuszonego pływania i zawieszania za ogon, zaobserwowano zmniejszenie ruchliwości zwierząt jedynie dla związków: JJGW02 w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg oraz JJGW08 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg, co może świadczyć o ich potencjalnych właściwościach sedatywnych i być związane z brakiem aktywności w teście Porsolta. Pozostałe pochodne nie wpływały na ruchliwość zwierząt w tych eksperymentach.

W przypadku 1-minutowej sesji dla testu czterech płytek oraz 5-minutowej sesji dla testu uniesionego labiryntu krzyżowego badane związki, za wyjątkiem JJGW02, nie wpływały istotnie na ruchliwość spontaniczną zwierząt, co potwierdza specyficzność otrzymanych wyników. Związek JJGW02 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg powodował natomiast zmniejszenie aktywności lokomotorycznej zwierząt, sugerując jego właściwości sedatywne i związany z tym brak aktywności w tych eksperymentach.

Żaden z badanych związków w przeprowadzonych testach, nie wykazał właściwości stymulujących aktywność, zatem można stwierdzić, że uzyskane efekty działania nie są wynikiem ich właściwości psychostymulujących.

Warto dodać, że dowiedzione efekty sedatywne wśród badanych pochodnych, mogą być związane z ich powinowactwem do receptorów adrenergicznych α_1 , a konkretnie blokadą receptorów adrenergicznych α_1 w ośrodkowym układzie nerwowym. Wszystkie związki wykazały bowiem potencjalną aktywność adrenolityczną, kojarzoną najczęściej w takim przypadku z działaniem niepożądanym. Spoglądając na to z odmiennej perspektywy, można jednak poszukiwać potencjalnego zastosowania takich właściwości. Przykładowo prazosyna, powszechnie stosowany α_1 -adrenolityk, wykazuje w badaniach skuteczność w leczeniu zaburzeń snu [331], a także przeciwdziała objawom pobudzenia i agresji towarzyszących chorobie Alzheimera [332]. Poszukiwanie podobnych aktywności, wśród potencjalnych kandydatów w leczeniu schorzeń psychiatrycznych może poszerzać możliwości terapeutyczne i zachęca do prowadzenia szerszych badań w tym zakresie.

Farmakologia bezpieczeństwa

W kolejnym etapie badań sprawdzono profil bezpieczeństwa nowych pochodnych w ośrodkowym układzie nerwowym. Jako pierwszy, przeprowadzono test metalowego pręta u myszy, nazywany również testem katalepsji, badający zdolność związków do indukowania u zwierząt niepożądanego objawu w postaci katalepsji. Jego odzwierciedleniem u pacjentów są niekorzystne działania ze strony układu pozapiramidowego (sztywność mięśni, spowolnienie ruchów, drżenie spoczynkowe, trudności w utrzymaniu prawidłowej postawy ciała), które wywołuje niestety większość substancji aktywnych przeciwpsychotycznie, antagonizujących receptory dopaminergiczne D₂ (jak np. risperidon czy haloperidol), utrudniając tym samym efektywne leczenie [333]. Stan kataleptyczny u zwierząt charakteryzuje się bardzo specyficznym zeszywnieniem mięśni i niejako zastygnięciem postawy ciała, często w nienaturalnej pozycji. U chorych takie zależne od dawki niekorzystne efekty pozapiramidowe mogą być szczególnie uciążliwe, w przypadku już istniejących zaburzeń ruchowych, jak to ma miejsce u osób w podeszłym wieku [334].

Wszystkie badane związki oraz substancja odniesienia - olanzapina indukowały katalepsję u myszy, przy czym wyznaczone najniższe dawki kataleptogenne były 4-8 razy wyższe od najwyższych dawek aktywnych przeciwpsychotycznie, co sugeruje, że badane pochodne posiadają niski potencjał do wywoływania pozapiramidowych działań niepożądanych u pacjentów i dalsze testy sprawdzające ich aktywność oraz bezpieczeństwo powinny być kontynuowane.

Drugi z eksperymentów, test obracającego się pręta u myszy, określanej jako test rotarod, przeprowadzono natomiast, by ocenić wpływ związków na koordynację ruchową zwierząt. Zakłada się bowiem, że jeśli substancja zaburza koordynację ruchową zwierząt, może to świadczyć o jej właściwościach neurotoksycznych [313,335].

Na podstawie wyznaczonych wartości ED₅₀, można stwierdzić, że największe ryzyko wystąpienia działania neurotoksycznego (najniższe wartości ED₅₀) wykazały związki: JJGW03, JJGW07, JJGW08 i JJGW09, przy czym ich dawki zaburzające koordynację ruchową były średnio 7-11 razy wyższe niż najwyższe dawki aktywne przeciwpsychotycznie, co nie dyskwalifikuje ich z dalszych badań. Największą różnicę pomiędzy najniższą efektywną dawką przeciwpsychotyczną, a wartością ED₅₀ odnotowano dla związków: **JJGW01, JJGW02, JJGW07 i JJGW08**, co pozwala

przypuszczać, że będą one wykazywały najmniejszy potencjał neurotoksyczny, jednak wymaga to szerszych analiz.

Obok niekorzystnych działań ośrodkowych wśród leków psychiatrycznych, niestety bardzo często obserwuje się negatywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Najczęściej mogą pojawiać się: zmiany ciśnienia tętniczego (hipotonia ortostatyczna lub nadciśnienie), działanie proarytmiczne, zaburzenia rytmu serca, w tym: bradykardia lub tachykardia, wpływ na wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego i zaburzenia repolaryzacji, a także możliwe jest uszkodzenie komórek mięśnia sercowego [16]. Z perspektywy stosowania leków przeciwpsychotycznych, zwraca się uwagę szczególnie na: spadek ciśnienia tętniczego i działanie proarytmiczne. Występowanie hipotonii ortostatycznej, w większości przypadków związane jest z silnym działaniem adrenolitycznym, na skutek blokady postsynaptycznych receptorów adrenergicznych α_1 i niedostateczną odpowiedzią łożyska naczyniowego na presyjne działanie endogennych katecholamin. Natomiast działanie pro arytmiczne, wiąże się bezpośrednio z wydłużeniem odstępu QT w zapisie EKG i ryzykiem wystąpienia częstoskurczu komorowego oraz rozwojem zagrażającej życiu arytmii typu *torsade de pointes* [231,336]. Niebezpieczne częstoskurcze komorowe mogą prowadzić do nagłego zatrzymania krążenia i nagłej śmierci sercowej. Dlatego, w ramach farmakologii bezpieczeństwa, oceniono także wpływ związków na ciśnienie tętnicze i presyjne działanie po podaniu metoksaminy oraz na prawidłowe parametry EKG u szczurów.

Wszystkie badane związki (za wyjątkiem związku JJGW12, który obniżał ciśnienie skurczowe tylko w 50 minucie od podania), wykazały istotne działanie hipotensyjne, redukując wartości ciśnienia skurczowego już od 5 minuty od podania, równocześnie w mniejszym stopniu lub wcale nie obniżając ciśnienia rozkurczowego. Spośród wszystkich związków najsilniejszą aktywność wykazały pochodne: JJGW09 (najniższa dawka hipotensyjna 0,5 mg/kg) oraz: JJGW01 i JJGW08 (najniższa dawka hipotensyjna 1,0 mg/kg), a słabiej, w dawce 2,5 mg/kg działały: JJGW02 i JJGW11. Potencjalnie najbardziej bezpieczne, z punktu widzenia niepożądanego aktywności hipotensyjnej, okazały się związki: **JJGW03, JJGW07 i JJGW12**, które obniżały ciśnienie w dawce 5 mg/kg. Także związek **JJGW08** wykazał korzystny profil działania, gdyż jego najniższa dawka hipotensyjna okazała się ponad 6-krotnie wyższa od najniższej dawki aktywnej przeciwpsychotycznie.

Aby określić potencjalny mechanizm działania hipotensyjnego oraz dokładny sposób oddziaływań z receptorem (agonizm lub antagonizm), oznaczono wpływ

związków na presyjne działanie metoksaminy – selektywnego agonisty receptorów adrenergicznych α_1 . Hamowanie presyjnego działania metoksaminy, świadczy bowiem o aktywności α_1 -adrenolitycznej. Badane związki podawano w dawkach nie wywołujących istotnych zmian ciśnienia tętniczego krwi. Wszystkie testowane pochodne istotnie zmniejszały presyjną odpowiedź po podaniu metoksaminy, z czego najsilniejszą aktywność α_1 -adrenolityczną wykazały związki: JGW09 (w dawce 0,25 mg/kg) oraz: JGW01, JGW08 i JGW11 (w dawce 0,5 mg/kg). Słabsze właściwości α_1 -adrenolityczne zademonstrowały pochodne: JGW02 i JGW12, a najsłabsze: **JGW03 i JGW07**, zmniejszając przyrosty ciśnienia skurczowego odpowiednio w dawkach 1,0 oraz 2,5 mg/kg. Można zatem przyjąć, że aktywność hipotensyjna testowanych pochodnych wynika z ich silnych właściwości α_1 -adrenolitycznych [337].

Co więcej, w analizie EKG badane związki nie wpływały istotnie na odstęp PR, zespół QRS i kalkulowany odstęp QT, a w większości nie zaburzały również właściwej częstotliwości pracy serca. Jedynie dla związków: JGW02, JGW08, JGW09 i JGW11 zaobserwowano zmniejszenie częstotliwości pracy serca, które może potencjalnie stwarzać ryzyko rozwoju arytmii typu bradykardii. Zmiany częstotliwości pracy serca najczęściej związane są jedynie z niepokojącymi objawami, jak np.: zawroty głowy, kołatanie serca, omdlenia, czy też ogólne zmęczenie i nie dyskwalifikują związku jako potencjalnego leku, jednak wymagają dokładniejszych badań, w celu wykluczenia ewentualnego negatywnego wpływu na serce i rozwoju niebezpiecznych dla życia arytmii [338,339].

Badania rozszerzone

W kolejnym etapie wykonano poszerzone badania farmakologiczne dla dwóch najbardziej aktywnych pochodnych, o najsilniejszych właściwościach antagonistycznych wobec receptorów dopaminergicznych D_2 , a więc dla związku: **JGW08**, który wykazał najsilniejszą aktywność przeciwpsychotyczną w teście hiperlokomocji oraz dodatkowe potencjalne właściwości przeciwłękowe i korzystny profil farmakologiczny oraz **JGW07**, który poza słabszą aktywnością przeciwpsychotyczną i przeciwłękową, charakteryzował się również potencjalną aktywnością przeciwdepresyjną w przeprowadzonych testach. W pierwszej kolejności zweryfikowano zaobserwowane u myszy potencjalne działanie przeciwpsychotyczne w testach na szczurach, a konkretnie w teście otwartego pola oraz bramkowania

przedsygnalowego po podaniu MK-801. Dodatkowo, zbadano potencjalną aktywność przeciwlękową w teście zagrzebywania u myszy. W ostatnim etapie badań sprawdzono wpływ związków na funkcje kognitywne i pamięć długoterminową oraz zdolność do odwracania deficytów pamięciowych, indukowanych podaniem MK-801 w teście biernego unikania oraz rozpoznawania nowego obiektu u myszy. Liczne doniesienia naukowe wskazują bowiem, na istotny udział modulatorów receptorów dopaminergicznych D_2 oraz serotonergicznych $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$ i $5-HT_7$ w procesach poznawczych [281,340,341].

Jako pierwszy przeprowadzono test otwartego pola u szczurów po podaniu MK-801, który stanowi powszechne i istotne narzędzie do oceny potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej. Jak opisywano wcześniej, hiperlokomocja wywołana przez MK-801 u zwierząt, koreluje bezpośrednio z objawami pozytywnymi schizofrenii [299,342] i odzwierciedla powszechne u pacjentów pobudzenie psychoruchowe towarzyszące chorobie [343], a jej redukcja świadczy o potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej.

W teście otwartego pola po podaniu MK-801 aktywny okazał się tylko związek **JJGW08**, który istotnie redukował hiperlokomocję u szczurów w zakresie dawek 1,0-30,0 mg/kg, co potwierdziło jego potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną u innego gatunku zwierząt. Dla związku JJGW07 nie zaobserwowano istotnego działania. Można zakładać, że różnice w uzyskanych wynikach są związane bezpośrednio z budową chemiczną i aktywnością funkcjonalną związków, na korzyść obecności dłuższego łańcucha pentyłowego oraz znacznie silniejszych właściwości antagonistycznych wobec receptorów dopaminergicznych D_2 oraz serotonergicznych $5-HT_{1A}$ i $5-HT_7$ dla pochodnej JJGW08, ale wymaga to przeprowadzenia dodatkowych badań.

Drugi z wykonanych eksperymentów, test bramkowania przedsygnalowego po podaniu MK-801 u szczurów, jest podstawowym przykładem „modelu” zwierzęcego, pozwalającego badać deficyty bramkowania czuciowo-ruchowego, towarzyszące schizofrenii [344–346] i umożliwiającego poszukiwanie substancji o potencjalnych właściwościach przeciwpsychotycznych [353]. Najczęściej upośledzenie bramkowania sensomotorycznego jest związane z chorobami neuropsychiatrycznymi zaburzającymi funkcje motoryczne, sensoryczne i poznawcze, w tym szczególnie ze schizofrenią [347–352], a wiele leków stosowanych klinicznie, w tym neuroleptyki, mogą skutecznie odwracać to schorzenie [355,356]. Upośledzenie bramkowania sensomotorycznego

koreluje nie tylko z objawami pozytywnymi schizofrenii, takimi jak zaburzenia myśli i urojenia, ale także z deficytami kognitywnymi [299,300]. U gryzoni zaburzenie to można indukować między innymi blokując receptor NMDA, poprzez podanie antagonisty, MK-801 [353,354]. Uważa się, że bramkowanie przedsygnalowe odzwierciedla niejako mechanizmy korowo-limbiczne w kontroli różnych zaburzeń psychicznych [357–359] i służy do oceny przetwarzania wstępnych, nieświadomych informacji. Sam proces bramkowania sensomotorycznego ma miejsce w momencie, gdy słaby bodziec sensoryczny (tzw. prepuls) pojawia się na krótko przed silnym bodźcem wzdrzającym i powoduje tym samym zmniejszenie reakcji wzdrgnięcia (tzw. reakcji „startle”). Proces ten regulowany jest głównie w przodomózgowiu przez korę mezolimbiczną, wzgórze, czy też jądro połączone [344,351,360]. Związki odwracające zaburzenia bramkowania przedsygnalowego indukowane dizocylpiną, posiadają potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną.

W przeprowadzonym teście żaden z badanych związków, JJGW07 ani JJGW08 nie wykazał potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej i nie odwracał deficytów bramkowania sensomotorycznego wywołanych podaniem MK-801 u szczurów, utrzymując procent hamowania reakcji „startle” w granicach -3,3-19,2% dla związku JJGW07 oraz -0,2-24,4% dla związku JJGW08. Dostępne dane literaturowe wskazują niejednoznacznie na skuteczność atypowych neuroleptyków w odwracaniu deficytów bramkowania czuciowo-ruchowego indukowanych dizocylpiną, a równocześnie pokazują brak działania klasycznych neuroleptyków [356,361]. Dowiedziono, że ewentualne różnice w skuteczności atypowych leków mogą być związane z różnorodnością gatunkową testowanych szczepów zwierząt [356]. Dodatkowo, naukowcy zwracają również szczególną uwagę, na indukowanie zaburzeń schizofrenicznych przez MK-801, który niejako odzwierciedla nieprawidłowości chorobowe w kilku różnych rejonach limbicznych [362]. W przypadku badanych związków, brak potwierdzenia aktywności przeciwpsychotycznej w teście bramkowania przedsygnalowego u szczurów może zatem wynikać ze złożonej aktywności dizocylpiny i blokady receptorów NMDA w różnych rejonach mózgu [362], jednak wymaga to przeprowadzenia szerszych analiz.

W przypadku obu opisanych powyżej testów weryfikujących potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną wyselekcjonowanych związków, jako substancję odniesienia wykorzystano klozapinę, atypowy neuroleptyk, który skutecznie łagodzi objawy wytwórcze schizofrenii.

Ze względu na fakt, że wyselekcjonowane pochodne wykazały aktywność przeciwłękową w teście czterech płytek u myszy, ale nie były aktywne w teście uniesionego labiryntu krzyżowego, postanowiono zweryfikować uzyskane wyniki dodatkowo w teście zagrzebywania u myszy. Sam eksperyment nie dostarcza dla myszy negatywnego stresu, a raczej stanowi formę wzbogacenia środowiska, minimalizując cierpienie zwierząt laboratoryjnych. W warunkach laboratoryjnych typowo gatunkowe zachowanie myszy, takie jak kopanie i zagrzebywanie przejawia się w energicznym kopaniu w ściółce hodowlanej. Wykorzystanie tego zjawiska, pozwala badać związki o aktywności serotonergicznej i właściwościach przeciwłękowych, także stosowanych w zaburzeniach obsesyjno-kompulsywnych [363]. Badania wskazują bowiem, że myszy zagrzebują szklane kulki w swoim otoczeniu, a zachowanie to mogą hamować niskie dawki przeciwłękowych benzodiazepin [236,364].

Badane związki testowano w dawkach aktywnych przeciwpowietrznie. Zarówno związek **JJGW07** jak i **JJGW08** wykazały potencjalną aktywność przeciwłękową, zmniejszając liczbę zagrzebanych kulek w dawkach odpowiednio: 0,625 i 1,25 mg/kg oraz 1,25 i 2,5 mg/kg. Potwierdza to zatem ich wcześniejszą aktywność uzyskaną w teście czterech płytek u myszy. Warto podkreślić, że dodatkowe działanie anksjolityczne stanowi duży atut dla związków potencjalnie stosowanych w leczeniu schizofrenii, dając możliwość łagodzenia współtowarzyszących chorobie objawów lękowych.

Ze względu na to, że test zagrzebywania u myszy przeprowadzono dla wyselekcjonowanych związków o zbadanej już wcześniej potencjalnej aktywności przeciwpowietrznej i przeciwłękowej, jako związku odniesienia w tym teście użyto aripiprazolu, atypowego neuroleptyku, który w licznych badaniach wykazuje dodatkową aktywność przeciwłękową [365].

W ostatnim etapie zweryfikowano wpływ wyselekcjonowanych związków na funkcje kognitywne i pamięć długoterminową. W pierwszej kolejności przeprowadzono test biernego unikania u myszy, badający zdolność uczenia się i zapamiętywania [366]. Sam test, pomimo niezależnego wpływu wielu różnych czynników (np. aktywności lokomotorycznej, wrażliwości na stres, wstrząsy elektryczne, czy też natężenie światła) i wynikającej z tego wysokiej liczby fałszywie pozytywnych wyników [367,368], jest wciąż jednym z najczęściej wybieranych testów pamięciowych. Ze względu na fakt, że pacjenci cierpiący na schorzenia psychiatryczne bardzo często doświadczają równocześnie pełnego spektrum zaburzeń poznawczych [369], pożądane jest unikanie

leków, które dodatkowo wywołują lub pogarszają istniejące deficyty kognitywne. Wydłużenie czasu latencji zwierząt w sesji odtwarzania podczas eksperymentu, świadczy o braku negatywnego działania na funkcje kognitywne.

Żaden z badanych związków, w testowanych dawkach aktywnych przeciwpowietrznie, nie powodował zaburzeń pamięci i uczenia się w przeprowadzonym teście, istotnie wydłużając czasy latencji zwierząt w sesji odtwarzania. Brak negatywnego wpływu na funkcje poznawcze jest niezwykle ważny dla potencjalnych leków przeciwpowietrznych i daje szersze możliwości ich stosowania, bez niekorzystnych efektów ubocznych.

Badając wpływ na funkcje poznawcze, istotne jest zweryfikowanie zdolności do odwracania deficytów pamięciowych, a tym samym potencjalne działanie prokognitywne. Jednym ze sposobów wywołania farmakologicznie deficytów pamięciowych u zwierząt jest podanie antagonisty receptora NMDA, MK-801, blokującego transmisję glutaminergiczną [368,370]. Glutaminian i receptory NMDA są zaangażowane w procesy poznawcze, odpowiadając szczególnie za powstawanie pamięci. Badania potwierdzają, że odpowiednia stymulacja receptorów NMDA wywołuje długotrwałe wzmocnienie w hipokampie, co jest bezpośrednio powiązane ze zmianami w plastyczności synaptycznej, obserwowanej podczas procesów uczenia się i pamięci [371–373]. Co więcej, udowodniono, że zaburzenia kognitywne wywołane podaniem MK-801, mogą być odwracane za pośrednictwem klinicznie stosowanych substancji w dysfunkcjach pamięci, jak np. inhibitorów cholinesterazy: galantaminy czy donepezilu [374]. W teście biernego unikania u myszy podanie MK-801, powoduje znaczne skrócenie czasu latencji zwierząt w sesji odtwarzania. Zdolność związku do odwracania wywołanych zaburzeń pamięci, świadczy o jego potencjalnych właściwościach prokognitywnych.

Wśród badanych pochodnych **JJGW07** tylko w jednej dawce, równej 1,25 mg/kg odwracał niekorzystne działanie dizocylpiny i wydłużał czas latencji myszy w sesji odtwarzania. Drugi z badanych związków **JJGW08** w dawkach 0,3 i 2,5 mg/kg wykazał podobne właściwości, co sugeruje możliwe działanie prokognitywne dla obu wyselekcjonowanych związków w wymienionych dawkach. Warto zauważyć, że związek **JJGW07** działał tylko w jednej dawce i tym samym wykazał tzw. efekt dawki w kształcie odwróconej litery „U”, który w świecie naukowców wciąż pozostaje bardzo trudny do wyjaśnienia [375]. Na podstawie dostępnej literatury można zakładać, że taka nieliniowa zależność może być cechą wspólną dla środków działających przez receptory

serotonergiczne [278], jednak wymaga to szerszych badań. Z drugiej strony, w przypadku związku JJGW08 obserwujemy przeciwnie tzw. efekt dawki w kształcie litery „U” (związek działał tylko w najniższej i najwyższej dawce). Taki typ zależności krzywoliniowej ma istotne znaczenie epidemiologiczne i toksykologiczne, często stwarzając problem w ocenie pomiędzy potencjalnym ryzykiem a korzyściami danego środka farmakologicznie aktywnego [376].

Drugim testem przeprowadzonym aby ocenić wpływ związków na funkcje poznawcze i pamięć długoterminową, był test rozpoznawania nowego obiektu u myszy [377]. Dostępna literatura wskazuje, że w procesach pamięciowych bazujących na rozpoznawaniu obiektów, biorą udział głównie kora śródwęczowa i hipokamp [378,379]. Za rozpoznanie obiektu, a więc stwierdzenie, czy dany przedmiot jest nowy, czy już znany, odpowiada kora śródwęczowa, natomiast hipokamp bierze udział w zapamiętywaniu informacji i kodowanie powiązanych z danym obiektem doświadczeń [378,380]. Zasada eksperymentu opiera się na naturalnej preferencji zwierząt do eksploracji nowego obiektu, w porównaniu ze znanym już przedmiotem [381]. Zaburzenie pamięci stwierdza się w przypadku, gdy czasy eksploracji obu różnych obiektów są porównywalne w ciągu 20-sekundowego okresu badawczego.

Wyniki wskazują, że związek JJGW07 w testowanych dawkach aktywnych przeciwpsychotycznie oraz JJGW08 w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg wywołują zaburzenia pamięci, ponieważ zaobserwowane czasy eksploracji obu obiektów były zbliżone (w granicach 10 sekund). Natomiast dla niższych dawek związku **JJGW08** (0,15, 0,3 i 0,625 mg/kg) czas eksploracji nowego obiektu był istotnie wyższy od 10 sekund, co świadczy o braku negatywnego wpływu na funkcje poznawcze i potwierdza wyniki otrzymane we wcześniejszym teście biernego unikania. Różnice w uzyskanych wynikach pomiędzy przeprowadzonymi eksperymentami mogą być związane ze znacznie słabszymi właściwościami antagonistycznymi JJGW07 wobec receptorów serotonergicznych 5-HT_{1A} i 5-HT₇ w porównaniu do aktywnego związku JJGW08, a także wynikać z charakteru obu testów. W teście biernego unikania wykorzystuje się bowiem bodziec lękowy i tym samym aktywacji ulegają inne struktury mózgowie niż w teście rozpoznawania nowego obiektu. Co więcej, test biernego unikania dotyczy bezpośrednio procesów uczenia się i zapamiętywania, podczas gdy test rozpoznawania nowego obiektu skupia się na naturalnej preferencji zwierząt do eksploracji nowych, nieznanych przedmiotów. Można zakładać, że związek JJGW07 oraz wyższe dawki związku JJGW08 wpływają niekorzystnie na struktury mózgu odpowiedzialne za

procesy rozpoznawania i zapamiętywania, w tym szczególnie hipokamp, co przekłada się na otrzymane wyniki w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy.

Podobnie jak opisywano powyżej, dla testu rozpoznawania nowego obiektu również sprawdzono zdolność do odwracania deficytów pamięciowych indukowanych podaniem MK-801 [368,382]. W przypadku potencjalnych właściwości prokognitywnych związku, obserwuje się istotne zwiększenie czasu eksploracji dla nowego obiektu powyżej 10 sekund.

Badanie przeprowadzono jedynie dla trzech dawek związku **JJGW08**, tj.: 0,15, 0,3 i 0,625 mg/kg, które wcześniej nie wywoływały zaburzeń pamięci. Wyniki wskazują, że badany związek tylko w dawce 0,15 mg/kg powodował, że czas eksploracji nowego obiektu różnił się istotnie od 10 sekund, co sugeruje jego właściwości prokognitywne. W pozostałych testowanych dawkach związek nie odwracał deficytów pamięciowych u zwierząt.

Zarówno dla testu biernego unikania jak i testu rozpoznawania nowego obiektu, które wykonano dla dwóch wybranych związków o zbadanej już wcześniej potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej, jako związku odniesienia użyto aripiprazolu, atypowego neuroleptyku, który w licznych badaniach wykazuje korzystny efekt na funkcje poznawcze [383].

Podsumowanie

Prowadzone od lat badania nad pochodnymi arylopiiperazyny, potwierdzają ich zróżnicowane powinowactwo receptorowe i związaną z tym szeroką aktywność farmakologiczną. W badaniach *in vitro*, wśród badanej grupy ośmiu nowych arylopiiperazynoalkilowych pochodnych salicylamidu, wszystkie związki wykazały powinowactwo względem receptorów dopaminergicznych D₂, serotoninerdycznych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₇ oraz adrenergicznych α₁, natomiast nie wiązały się istotnie z receptorami serotoninerdycznymi 5-HT₆ i adrenergicznymi α₂. Badania funkcjonalne wykazały, że testowane związki są agonistami (JJGW01, JJGW02, JJGW03) lub antagonistami (JJGW07, JJGW08, JJGW09, JJGW11 i JJGW12) receptorów dopaminergicznych D₂, antagonistami receptorów serotoninerdycznych 5-HT_{1A} (za wyjątkiem częściowego agonisty - JJGW03) i 5-HT₇ oraz częściowymi agonistami (JJGW02, JJGW07, JJGW08 i JJGW09) lub antagonistami (JJGW01, JJGW03 i JJGW11) receptorów serotoninerdycznych 5-HT_{2A} (za wyjątkiem związku JJGW12).

Co więcej, wszystkie pochodne wykazały również silne właściwości α_1 -adrenolityczne. Uzyskane wyniki powinowactwa receptorowego sugerują potencjalne właściwości przeciwpsychotyczne, a także przeciwdepresyjne i przeciwłękowe badanych pochodnych oraz możliwe działanie prokognitywne i hipotensyjne.

W celu zweryfikowania potencjalnych właściwości przeciwpsychotycznych wykonano test hiperlokomocji indukowanej podaniem dizocyliny oraz amfetaminy u myszy. Za wyjątkiem związków JJGW11 i JJGW12, wszystkie badane pochodne wykazały potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną w obu testach, przy czym najsilniejsze były: **JJGW01, JJGW02, JJGW07 i JJGW08**. Dla sprawdzenia potencjalnych właściwości przeciwdepresyjnych przeprowadzono test wymuszonego pływania oraz zawieszania za ogon u myszy. Żaden z badanych związków nie wykazał aktywności w teście wymuszonego pływania, natomiast w teście zawieszania za ogon aktywne były związki: **JJGW01, JJGW03, JJGW07 i JJGW09**. Potencjalne właściwości przeciwłękowe zbadano za pośrednictwem testu czterech płytek oraz uniesionego labiryntu krzyżowego. W teście czterech płytek aktywność wykazały związki: **JJGW01, JJGW07, JJGW08 i JJGW09**, natomiast żadna z badanych pochodnych nie była aktywna w teście uniesionego labiryntu krzyżowego. Co istotne, badane związki nie wpływały na ruchliwość spontaniczną zwierząt w żadnym z przeprowadzonych testów (za wyjątkiem związku JJGW08 w teście wymuszonego pływania i teście zawieszania za ogon oraz JJGW02 we wszystkich eksperymentach, poza testem hiperlokomocji), co sugeruje, że otrzymane wyniki są specyficzne. W teście wymuszonego pływania i zawieszania za ogon związek JJGW08 w najwyższych dawkach, tj. 1,25 i 2,5 mg/kg zwiększał czas bezruchu zwierząt oraz równocześnie zmniejszał ruchliwość spontaniczną myszy, co może świadczyć o jego potencjalnych właściwościach sedatywnych w tych dawkach. Podobnie dla związku JJGW02, który także wpływał na zmniejszenie aktywności lokomotorycznej zwierząt w przeprowadzonych testach w zakresie dawek 0,625-2,5 mg/kg, można zakładać jego potencjalne właściwości sedatywne. Żaden z badanych związków nie wykazał natomiast działania nasilającego aktywność ruchową, co pozwala stwierdzić, że obserwowane wyniki nie są powiązane z efektem psychostymulującym.

Wszystkie aktywne przeciwpsychotycznie związki wykazały również właściwości kataleptogenne, jednak obserwowano je w dawkach 4-8-krotnie wyższych niż najwyższe dawki aktywne przeciwpsychotycznie, co wskazuje na niski potencjał do indukowania niepożądanych objawów pozapiramidowych. Dodatkowo, żaden

z badanych związków nie wpływał niekorzystnie na koordynację zwierząt w dawkach aktywnych w powyższych testach behawioralnych, sugerując brak negatywnego działania neurotoksycznego w zakresie tych dawek. Najbezpieczniejsze pod względem potencjalnej neurotoksyczności wydają się być związki: **JJGW01**, **JJGW02**, **JJGW07** i **JJGW08**, dla których zaobserwowano największą różnicę pomiędzy najniższymi aktywnymi dawkami przeciwpsychotycznymi, a wartością ED₅₀.

W badaniach farmakologii bezpieczeństwa, weryfikujących wpływ na układ krążenia, dla wszystkich związków zaobserwowano istotne działanie obniżające ciśnienie tętnicze krwi, przy czym najbardziej bezpieczne w tym zakresie wydają się być związki: **JJGW03**, **JJGW07**, **JJGW08** i **JJGW12**. Co więcej, potwierdzono istotną aktywność α_1 -adrenolityczną dla wszystkich testowanych pochodnych, z czego mogą wynikać ich zaobserwowane właściwości hipotensyjne. Badane związki nie wpływały istotnie na prawidłowy elektrokardiogram u szczurów. Jedynie dla pochodnych: JJGW02, JJGW08, JJGW09 i JJGW11 zaobserwowano zmniejszenie częstotliwości pracy serca, co nie dyskwalifikuje związków z dalszych badań, jednak wymaga przeprowadzenia szerszych analiz.

Na podstawie otrzymanych wyników z wstępnych badań skринingowych, wybrano dwie struktury do badań poszerzonych, o najwyższej aktywności i równocześnie najsilniejszych właściwościach antagonistycznych wobec receptorów dopaminergicznych D₂, tj.: **JJGW08**, wykazujący najsilniejszą aktywność przeciwpsychotyczną w teście hiperlokomocji oraz dodatkowe potencjalne właściwości przeciwlękowe i korzystny profil farmakologiczny oraz **JJGW07**, który poza słabszą aktywnością przeciwpsychotyczną i przeciwlękową, charakteryzował się również potencjalną aktywnością przeciwdepresyjną w przeprowadzonych testach. Oba związki, będące pochodnymi 2-metoksyfenylopiperyliny z ugrupowaniem butylowym (JJGW07) lub pentylowym (JJGW08), poza antagonizmem do receptorów dopaminergicznych D₂, są równocześnie częściowymi agonistami receptorów serotonergicznymi 5-HT_{2A} oraz antagonistami receptorów serotonergicznymi 5-HT_{1A} i 5-HT₇.

Wśród obu pochodnych, tylko związek **JJGW08** wykazał potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną w teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów. Właściwości tych nie udało się potwierdzić w drugim teście, bramkowania przedsygnałowego po podaniu MK-801 u szczurów. Co więcej, obie badane pochodne zademonstrowały również potencjalną aktywność przeciwlękową w teście

zagrzebywania u myszy. Dodatkowo, oba związki nie wpływały negatywnie na funkcje kognitywne w teście biernego unikania u myszy, a w niektórych dawkach nawet odwracały deficyty pamięci indukowane podaniem MK-801 w tym teście, co sugeruje ich potencjalne właściwości prokognitywne. W teście rozpoznawania nowego obiektu tylko dla związku JJGW08 udało się zaobserwować podobne właściwości.

Podsumowując, z całej grupy badanych pochodnych, najbardziej obiecujący jako kandydat do dalszych badań wydaje się być związek **JJGW08**, którego charakteryzują potencjalne właściwości przeciwpsychotyczne, przeciwłękowe i prokognitywne oraz korzystny profil farmakologiczny. Druga z wyselekcjonowanych pochodnych, JJGW07, pomimo braku aktywności w testach przeciwpsychotycznych u szczurów, także zasługuje na uwagę, gdyż obok wymienionych właściwości dla związku JJGW08, wykazała również pożądaną, potencjalną aktywność przeciwdepresyjną. Zdecydowanie warto więc kontynuować badania nad tymi związkami, jako strukturami modelowymi w procesie poszukiwania nowych leków, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu schorzeń ośrodkowego układu nerwowego.

7 Wnioski

1. Spośród 8 przebadanych arylopiperazynoalkilowych pochodnych salicylamidu o istotnym powinowactwie do receptorów dopaminergicznych D_2 , serotoninerdycznych $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$ i $5-HT_7$ oraz adrenergicznych α_1 , 6 wykazało potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną w teście hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 oraz amfetaminy u myszy, przy czym najsilniej działały związki: **JJGW01, JJGW02, JJGW07 i JJGW08**.
2. Dodatkowo, 4 związki wykazały potencjalną aktywność przeciwdepresyjną w teście zawieszania za ogon u myszy (**JJGW01, JJGW03, JJGW07 i JJGW09**) oraz potencjalną aktywność przeciwłkową w teście czterech płytek u myszy (**JJGW01, JJGW07, JJGW08 i JJGW09**).
3. Aktywne związki nie wpływały na ruchliwość spontaniczną zwierząt, ani też nie działały neurotoksycznie w dawkach przeciwpsychotycznych.
4. Wszystkie związki aktywne w teście hiperlokomocji wykazały zdolność do indukowania katalepsji u myszy, przy czym ich najniższe dawki kataleptogenne były 4-8-krotnie wyższe od najwyższych dawek aktywnych przeciwpsychotycznie.
5. Wszystkie badane pochodne wykazały działanie hipotensyjne, wynikające prawdopodobnie z ich silnego działania α_1 -adrenolitycznego, gdyż hamowały one presyjną odpowiedź po podaniu metoksaminy u szczurów.
6. Badane związki nie wpływały istotnie na prawidłowy elektrokardiogram u szczurów, za wyjątkiem związków: JJGW02, JJGW08, JJGW09 i JJGW11, dla których zaobserwowano zmniejszenie częstotliwości pracy serca zwierząt.
7. Spośród przebadanych związków wybrano dwie struktury do badań poszerzonych, będące pochodnymi 2-metoksyfenylopiperazyny, o potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej, przeciwłkowej i/lub przeciwdepresyjnej oraz o najsilniejszych właściwościach antagonistycznych wobec receptorów dopaminergicznych D_2 , tj.: **JJGW07 i JJGW08**, które równocześnie działają jako częściowi agoniści receptorów serotoninerdycznych $5-HT_{2A}$ oraz antagonisty receptorów serotoninerdycznych $5-HT_{1A}$ i $5-HT_7$.
8. W teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów potwierdzono potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną tylko dla związku **JJGW08**.

9. Żadna z wyselekcjonowanych pochodnych nie wykazała potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej w teście bramkowania przedsygnałowego po podaniu MK-801 u szczurów.
10. Zarówno dla związku JJGW07, jak i dla JJGW08 potwierdzono potencjalną aktywność przeciwłękową w teście zagrzebywania u myszy.
11. Badane związki nie wpływały negatywnie na funkcje kognitywne myszy w teście biernego unikania, a co więcej, odwracały deficyty pamięci indukowane podaniem MK-801 w tym samym teście.
12. W teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy tylko związek JJGW08 nie zaburzał procesów pamięciowych i był zdolny odwrócić zaburzenia indukowane dizocypiną.
13. Spośród całej grupy badanych pochodnych salicylamidu najbardziej aktywne okazały się związki z ugrupowaniem 2-metoksyfenylopiperazynowym oraz grupą butylową (JJGW07) lub pentyłową (JJGW08) w pozycji 4 piperazyny.
14. Wyniki przeprowadzonych badań zachęcają do kontynuowania prac badawczych dla wyselekcjonowanych związków, by poznać ich pełny profil farmakologiczny i bezpieczeństwo stosowania przy podaniu wielokrotnym.
15. Nowe pochodne, oddziałujące za pośrednictwem receptorów dopaminergicznych D_2 oraz serotoninerdycznych $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$ i $5-HT_7$, mogą stanowić struktury modelowe w procesie poszukiwania nowych leków do terapii zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego, a szczególnie schizofrenii z współtowarzyszącymi schorzeniami dodatkowymi takimi jak: depresja, lęk i zaburzenia poznawcze.

Streszczenie

Zaburzenia psychiatryczne, w tym szczególnie schizofrenia, są obecnie jednymi z najczęściej diagnozowanych schorzeń w krajach rozwiniętych. Dostępne leki przeciwpsychotyczne posiadają niestety ograniczoną skuteczność, a często charakteryzują się również niekorzystnymi działaniami niepożądanymi. Największym problemem pozostają objawy negatywne, a także leczenie schorzeń współtowarzyszących, takich jak: depresja, lęk czy zaburzenia kognitywne. Dlatego niezmiernie istotne jest poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych, uwzględniających powyższe trudności, by móc skuteczniej i bezpieczniej leczyć problematyczne zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego.

Celem niniejszej pracy było oznaczenie potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej, a także przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej w grupie ośmiu nowych arylopiperazynoalkilowych pochodnych salicylamidu. Dodatkowo, zweryfikowano zdolność związków do indukowania katalepsji u myszy oraz sprawdzono ich wpływ na koordynację ruchową i aktywność lokomotoryczną u myszy. W ramach farmakologii bezpieczeństwa zbadano również wpływ związków na układ sercowo-naczyniowy. Dla najbardziej aktywnych struktur zaplanowano testy rozszerzone, m.in. zbadanie potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej u szczurów, a także określenie ich wpływu na funkcje kognitywne u zwierząt.

W badaniach *in vitro* testowane związki wykazały istotne powinowactwo do receptorów dopaminergicznych D_2 , serotonergicznych $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$ i $5-HT_7$ oraz adrenergicznych α_1 , natomiast nie wiązały się istotnie z receptorami serotonergicznymi $5-HT_6$ i adrenergicznymi α_2 . Badania funkcjonalne potwierdziły, że wszystkie testowane związki są agonistami (JGW01, JGW02, JGW03) lub antagonistami (JGW07, JGW08, JGW09, JGW11 i JGW12) receptorów dopaminergicznych D_2 , antagonistami receptorów serotonergicznych $5-HT_{1A}$ (za wyjątkiem częściowego agonisty - JGW03) i $5-HT_7$ oraz częściowymi agonistami (JGW02, JGW07, JGW08 i JGW09) lub antagonistami (JGW01, JGW03 i JGW11) receptorów serotonergicznych $5-HT_{2A}$ (za wyjątkiem związku JGW12). Co więcej, wszystkie pochodne wykazały również silne właściwości α_1 -adrenolityczne.

W badaniach behawioralnych, w pierwszej kolejności zweryfikowano właściwości przeciwpsychotyczne związków w teście hiperlokomocji indukowanej

podaniem MK-801 oraz amfetaminy u myszy. W testach tych wszystkie związki, za wyjątkiem JJGW11 i JJGW12, zademonstrowały potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną, z czego najsilniej działały pochodne: JJGW01, JJGW02, JJGW07 i JJGW08. Właściwości przeciwdepresyjne sprawdzono w dwóch kolejnych testach: w teście wymuszonego pływania oraz zawieszania za ogon u myszy. Żaden z badanych związków nie wykazał aktywności w teście wymuszonego pływania, natomiast cztery pochodne: JJGW01, JJGW03, JJGW07 i JJGW09 wykazały potencjalną aktywność przeciwdepresyjną w teście zawieszania za ogon. Badanie właściwości przeciwlękowych przeprowadzono za pośrednictwem testu czterech płytek oraz uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy. W teście czterech płytek działanie anksjolityczne wykazały związki: JJGW01, JJGW07, JJGW08 i JJGW09, natomiast żadna z badanych pochodnych nie była aktywna w teście uniesionego labiryntu krzyżowego. Co istotne, badane związki nie wpływały na ruchliwość spontaniczną zwierząt w żadnym z przeprowadzonych eksperymentów (za wyjątkiem związku JJGW08 w teście wymuszonego pływania i zawieszania za ogon oraz JJGW02 we wszystkich eksperymentach, poza testem hiperlokomocji), co sugeruje, że otrzymane wyniki są specyficzne. Zaobserwowane efekty dla pochodnej JJGW08 i JJGW02, mogą świadczyć o ich ewentualnych właściwościach sedatywnych w wyższych dawkach.

Dla wszystkich związków aktywnych przeciwpsychotycznie stwierdzono również zdolność do indukowania katalepsji u myszy, jednak najniższe dawki kataleptogenne były około 4-8-krotnie wyższe niż najwyższe dawki aktywne przeciwpsychotycznie. Sugeruje to, że badane związki posiadają niski potencjał do wywoływania zaburzeń pozapiramidowych. Dodatkowo, żadna z testowanych pochodnych w aktywnych dawkach nie wpływała negatywnie na koordynację ruchową myszy w teście rotarod, co sugeruje, że związki te nie działają neurotoksycznie w tych dawkach.

Badania farmakologii bezpieczeństwa, weryfikujące wpływ na układ sercowo-naczyniowy wykazały istotny efekt redukujący ciśnienie tętnicze krwi u szczurów dla wszystkich testowanych związków. Aktywność hipotensyjna wynika prawdopodobnie z ich działania α_1 -adrenolitycznego, gdyż wszystkie związki hamowały presyjną odpowiedź po podaniu metoksaminy. Co ważne, testowane pochodne nie wpływały negatywnie na prawidłowy elektrokardiogram u szczurów i mierzone parametry, tj.: odcinek PR, zespół QRS i kalkulowany odstęp QT. Jedynie dla pochodnych: JJGW02, JJGW08, JJGW09 i JJGW11 zaobserwowano zmniejszenie częstotliwości pracy serca,

co nie dyskwalifikuje związków z dalszych badań, jednak wymaga przeprowadzenia szerszych analiz.

Na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonowano dwie najbardziej aktywne pochodne: JJGW07 i JJGW08 do badań poszerzonych. W pierwszej kolejności zweryfikowano ich potencjalne właściwości przeciwpsychotyczne w testach u szczurów, tj.: w teście otwartego pola oraz bramkowania przed sygnałowym po podaniu MK-801. W teście otwartego pola potencjalną aktywność przeciwpsychotyczną wykazał tylko związek JJGW08, natomiast druga pochodna JJGW07 nie działała w eksperymencie. Co więcej, żaden z badanych związków nie był aktywny w teście bramkowania sensomotorycznego u szczurów. Dla badanych związków wykonano dodatkowo test zagrzebywania u myszy, sprawdzający działanie anksjolityczne, w którym potencjalną aktywność przeciwłękową wykazały obie pochodne. W ostatnim etapie zweryfikowano wpływ związków na funkcje kognitywne i pamięć długoterminową w teście biernego unikania oraz rozpoznawania nowego obiektu u myszy. W teście biernego unikania zarówno związek JJGW07 jak i JJGW08 nie wywoływały zaburzeń pamięci u zwierząt, a dodatkowo oba związki odwracały deficyty pamięci wywołane podaniem MK-801, sugerując potencjalne działanie prokognitywne. Z kolei w teście rozpoznawania nowego obiektu u myszy związek JJGW07 powodował zaburzenia pamięci. Tylko pochodna JJGW08 nie zaburzała funkcji pamięciowych u zwierząt i odwracała deficyty kognitywne indukowane dizocylpiną w tym teście, co potwierdza jej potencjalne właściwości prokognitywne.

Wyniki przeprowadzonych badań behawioralnych potwierdzają potencjalne działanie przeciwpsychotyczne, przeciwłękowe i/lub przeciwdepresyjne, a także możliwą aktywność prokognitywną dla testowanych związków, co zachęca do kontynuowania badań nad wyselekcjonowanymi pochodnymi, w celu poznania ich pełnego profilu farmakologicznego, mechanizmu działania oraz bezpieczeństwa stosowania przy podaniu wielokrotnym. Badane związki mogą stanowić struktury modelowe w procesie poszukiwania nowych leków do terapii zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego, a szczególnie leczenia schizofrenii z współtowarzyszącą depresją, lękiem oraz zaburzeniami kognitywnymi.

Summary

Psychiatric disorders, especially schizophrenia, are one of the most frequently diagnosed diseases in developed countries nowadays. Unfortunately, the available antipsychotics have limited efficacy and numerous side effects. Negative symptoms and comorbid disturbances such as: depression, anxiety or cognitive impairments still remain the biggest problem. Therefore, it is extremely important to look for new therapeutic solutions for better and safer treatment of central nervous system disorders.

The aim of this study was to evaluate antipsychotic-, antidepressant- and anxiolytic-like activity in the group of eight arylpiperazine alkyl derivatives of salicylamide. Additionally, cataleptogenic activity and the influence on motor coordination as well as spontaneous locomotor activity in mice were verified. Moreover, the effect on cardiovascular system was investigated, as a part of safety pharmacology. For the most active structures some expanded studies were planned, including antipsychotic tests in rats and determination of the effect on cognitive functions in animals.

Preliminary *in vitro* studies showed significant affinity for dopaminergic D₂, serotonergic 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₇ as well as adrenergic α_1 receptors. None of the compounds significantly bound to serotonergic 5-HT₆ and adrenergic α_2 receptors. Functional studies confirmed that all tested compound were agonists (JJGW01, JJGW02, JJGW03) or antagonists (JJGW07, JJGW08, JJGW09, JJGW11, JJGW12) of dopaminergic D₂ receptors, antagonists of serotonergic 5-HT_{1A} (excluding partial agonist – JJGW03) and 5-HT₇ receptors as well as partial agonists (JJGW02, JJGW07, JJGW08 and JJGW09) or antagonists (JJGW01, JJGW03 and JJGW11) of 5-HT_{2A} receptors (excluding JJGW12). Moreover, all tested derivatives showed also strong α_1 -adrenolytic activity.

First, in behavioral studies, the antipsychotic-like activity was determined in hyperlocomotion tests induced by MK-801 and amphetamine in mice. In these tests, all compounds, except for JJGW11 and JJGW12, demonstrated antipsychotic-like activity. The most active were compounds: JJGW01, JJGW02, JJGW07 and JJGW08. The antidepressant-like properties were evaluated in the next two tests: the forced swimming and the tail suspension test in mice. None of the tested compounds were active in the forced swimming test, while four derivatives: JJGW01, JJGW03, JJGW07 and JJGW09

showed antidepressant-like activity in the tail suspension test. The anxiolytic-like properties were performed using the four plate and the elevated plus-maze test in mice. In the four plate test, anxiolytic-like activity showed compounds: JJGW01, JJGW07, JJGW08 and JJGW09, whereas none of the tested derivatives were active in the elevated plus-maze test. Importantly, the tested compounds did not affect spontaneous locomotor activity of animals in any of the performed test (except for JJGW08 in the forced swimming and tail suspension test as well as JJGW02 in all experiments excluding hyperlocomotion test), suggesting that the obtained results were specific. The effects observed for compounds JJGW02 and JJGW08 may indicate their possible sedative properties at higher doses.

Moreover, the ability to induce catalepsy in mice was found for all compounds with antipsychotic-like activity, however the lowest cataleptogenic doses were about 4-8-fold higher than the highest “antipsychotic” doses. This suggests, that the tested compounds possess low potential to induce extrapyramidal symptoms. In addition, none of the tested derivatives affected motor coordination in mice rotarod test at active doses, what suggests that the compounds are not neurotoxic at these doses.

The studies of safety pharmacology, which verified the cardiovascular effects, demonstrated that all tested compounds significantly reduce the blood pressure in rats. The hypotensive activity is probably due to their α_1 -adrenolytic properties, since all compounds inhibited the pressor response to methoxamine. What is important, none of the tested compounds influenced the normal electrocardiogram in rats and measured parameters, i.e. PR interval, QRS complex and calculated QT interval. Decreased heart rate was observed only for derivatives: JJGW02, JJGW08, JJGW09 and JJGW11, which requires a broader analysis.

Based on the obtained results, two most active derivatives were selected for extended studies: JJGW07 and JJGW08. First, their antipsychotic-like activity in rats was investigated using the open field and the prepulse inhibition test after MK-801 administration. In the open field test, only JJGW08 showed antipsychotic-like activity, while JJGW07 was inactive. Moreover, none of the compounds were active in the prepulse inhibition test. On the other hand, both derivatives demonstrated anxiolytic-like activity in additionally performed marble burying test in mice. Finally, the influence of studied compounds on cognitive function and long-term memory was verified in the passive avoidance and the novel object recognition test in mice. In the passive avoidance test, none of the compounds induced any memory disturbances in

animals. Additionally, both derivatives reversed memory deficits induced by MK-801 in this test, suggesting their potential procognitive properties. Conversely, in the novel object recognition test compound JJGW07 caused memory deficits. Only JJGW08 did not disturb memory functions in animals, and even reversed cognitive impairments induced by dizocilpine in this test, which confirmed its potential procognitive properties.

The results of the behavioral studies confirm antipsychotic-, anxiolytic- and/or antidepressant-like activity as well as possible procognitive effects of the tested compounds in animals. This encourages to continue studies with selected derivatives, in order to understand their full pharmacological profile, mechanism of action and safety after repeated administration. The tested compounds may become a model structures in the process of searching for new drugs for the treatment of central nervous system diseases, especially schizophrenia with associated depression, anxiety and cognitive disturbances.

Bibliografia

- [1] World Health Organization, Schizophrenia, http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/ (accessed October 29, 2018).
- [2] A. Bilikiewicz, W. Strzyżewski, *Psychiatria: podręcznik dla studentów medycyny.*, ISBN 83-20, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1992.
- [3] E Bleuler, *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*, Leipzig: Franz Deuticke, 1911.
- [4] R. Kuhn, C.H. Cahn, Eugen Bleuler's concepts of psychopathology., *Hist. Psychiatry*. 15 (2004) 361–6. doi:10.1177/0957154X04044603.
- [5] D.G. Robinson, M.G. Woerner, M. McMeniman, A. Mendelowitz, R.M. Bilder, Symptomatic and Functional Recovery From a First Episode of Schizophrenia or Schizoaffective Disorder, *Am. J. Psychiatry*. 161 (2004) 473–479. doi:10.1176/appi.ajp.161.3.473.
- [6] K.R. Patel, J. Cherian, K. Gohil, D. Atkinson, Schizophrenia: overview and treatment options., *P T*. 39 (2014) 638–45.
- [7] American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed., Schizophre, Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- [8] S.M. Opoka, T.M. Lincoln, The Effect of Cognitive Behavioral Interventions on Depression and Anxiety Symptoms in Patients with Schizophrenia Spectrum Disorders, *Psychiatr. Clin. North Am.* 40 (2017) 641–659. doi:10.1016/j.psc.2017.08.005.
- [9] World Health Organization, *The Global Burden of Disease 2004*, http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf (accessed October 29, 2018).
- [10] C.J. Murray, A.D. Lopez, Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study., *Science*. 274 (1996) 740–3.
- [11] AT Beck, NA Rector, N. Stolar, P. Grant, *Schizophrenia: Cognitive Theory, Research, and Therapy.*, Biological, New York: Guilford Press, New York, 2009.
- [12] A.F. Lehman, J.A. Lieberman, L.B. Dixon, T.H. McGlashan, A.L. Miller, D.O.

- Perkins, J. Kreyenbuhl, American Psychiatric Association, Steering Committee on Practice Guidelines, Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition., *Am. J. Psychiatry.* 161 (2004) 1–56.
- [13] G Stotz-Ingenlath, E Bleuler, Epistemological aspects of Eugen Bleuler's conception of schizophrenia in 1911., *Med. Health Care. Philos.* 3 (2000) 153–159.
- [14] Adam Bilikiewicz, Stanisław Pużyński, Jacek Wciórka, Janusz Rybakowski, *Psychiatria. T.2*, Urban & Partner, Wrocław, 2003.
- [15] K Schneider, *Clinical Psychopathology.*, Grune and Stratton, New York, 1959.
- [16] HP Rang, MM Dale, JM Ritter, RJ Fowler, Rang and Dale's *Pharmacology* (6th Edition), Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007.
- [17] World Health Organisation, ICD-10, <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/F20> (accessed October 29, 2018).
- [18] H Lavretsky, History of Schizophrenia as a Psychiatric Disorder. In: Mueser KT, Jeste DV, editors. *Clinical Handbook of Schizophrenia.*, New York: Guilford Press, New York, 2008.
- [19] J.-U. Peters, Polypharmacology – Foe or Friend?, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 8955–8971. doi:10.1021/jm400856t.
- [20] A.L. Hopkins, Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 682–690. doi:10.1038/nchembio.118.
- [21] C.-I. Lau, H.-C. Wang, J.-L. Hsu, M.-E. Liu, Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia?, *Rev. Neurosci.* 24 (2013) 389–400. doi:10.1515/revneuro-2013-0011.
- [22] SM Stahl, Psychosis and Schizophrenia. In: Stahl SM, editor. *Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications.* 2nd ed., United Kingdom: Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
- [23] JH Schwartz, JA Javitch, Neurotransmitters. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, et al., editors. *Principles of Neural Science.* 5th ed, New York: McGraw-Hill, New York, 2013.
- [24] K.C. Berridge, T.E. Robinson, What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 28 (1998) 309–69.
- [25] A.E. Eggers, Extending David Horrobin's membrane phospholipid theory of

- schizophrenia: Overactivity of cytosolic phospholipase A2 in the brain is caused by overdrive of coupled serotonergic 5HT2A/2C receptors in response to stress, *Med. Hypotheses*. 79 (2012) 740–743. doi:10.1016/j.mehy.2012.08.016.
- [26] A.E. Eggers, A serotonin hypothesis of schizophrenia, *Med. Hypotheses*. 80 (2013) 791–794. doi:10.1016/j.mehy.2013.03.013.
- [27] O. Howes, R. McCutcheon, J. Stone, Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21st century, *J. Psychopharmacol.* 29 (2015) 97–115. doi:10.1177/0269881114563634.
- [28] F. Caraci, G.M. Leggio, S. Salomone, F. Drago, New drugs in psychiatry: focus on new pharmacological targets, *F1000Research*. 6 (2017) 397. doi:10.12688/f1000research.10233.1.
- [29] D. Kondziella, E. Brenner, E.M. Eyjolfsson, U. Sonnewald, How do glial–neuronal interactions fit into current neurotransmitter hypotheses of schizophrenia?, *Neurochem. Int.* 50 (2007) 291–301. doi:10.1016/j.neuint.2006.09.006.
- [30] J.M. Stone, P.D. Morrison, L.S. Pilowsky, Review: Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia — a synthesis and selective review, *J. Psychopharmacol.* 21 (2007) 440–452. doi:10.1177/0269881106073126.
- [31] J. Jentsch, R.H. Roth, The Neuropsychopharmacology of Phencyclidine From NMDA Receptor Hypofunction to the Dopamine Hypothesis of Schizophrenia, *Neuropsychopharmacology*. 20 (1999) 201–225. doi:10.1016/S0893-133X(98)00060-8.
- [32] C. de la Fuente-Sandoval, P. León-Ortiz, R. Favila, S. Stephano, D. Mamo, J. Ramírez-Bermúdez, A. Graff-Guerrero, Higher Levels of Glutamate in the Associative-Striatum of Subjects with Prodromal Symptoms of Schizophrenia and Patients with First-Episode Psychosis, *Neuropsychopharmacology*. 36 (2011) 1781–1791. doi:10.1038/npp.2011.65.
- [33] N.B. Farber, The NMDA receptor hypofunction model of psychosis., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003 (2003) 119–30.
- [34] P Paoletti, J Neyton, NMDA receptor subunits: function and pharmacology, *Curr. Opin. Pharmacol.* 7 (2007) 39–47. doi:10.1016/j.coph.2006.08.011.
- [35] DC Goff, Glutamate receptors in schizophrenia and antipsychotic drugs. In *Neurotransmitter Receptors in Actions of Antipsychotic Medications*, CRC Press: New York, NY, USA, New York, 2000.

- [36] F.M. Benes, The GABA System in Schizophrenia: Cells, Molecules and Microcircuitry, *Schizophr. Res.* 167 (2015) 1–3. doi:10.1016/j.schres.2015.07.017.
- [37] I.F. Tso, Y. Fang, K.L. Phan, R.C. Welsh, S.F. Taylor, Abnormal GABAergic function and face processing in schizophrenia: A pharmacologic-fMRI study, *Schizophr. Res.* 168 (2015) 338–344. doi:10.1016/j.schres.2015.08.022.
- [38] F. Benes, S. Berretta, GABAergic Interneurons Implications for Understanding Schizophrenia and Bipolar Disorder, *Neuropsychopharmacology*. 25 (2001) 1–27. doi:10.1016/S0893-133X(01)00225-1.
- [39] A. Guidotti, J. Auta, J.M. Davis, E. Dong, D.R. Grayson, M. Veldic, X. Zhang, E. Costa, GABAergic dysfunction in schizophrenia: new treatment strategies on the horizon, *Psychopharmacology (Berl)*. 180 (2005) 191–205. doi:10.1007/s00213-005-2212-8.
- [40] J.C. Garbutt, D.P. van Kammen, The interaction between GABA and dopamine: implications for schizophrenia., *Schizophr. Bull.* 9 (1983) 336–53.
- [41] K. Yamamoto, O. Hornykiewicz, Proposal for a noradrenaline hypothesis of schizophrenia, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 28 (2004) 913–922. doi:10.1016/j.pnpbp.2004.05.033.
- [42] V. Maletic, A. Eramo, K. Gwin, S.J. Offord, R.A. Duffy, The Role of Norepinephrine and Its α -Adrenergic Receptors in the Pathophysiology and Treatment of Major Depressive Disorder and Schizophrenia: A Systematic Review., *Front. Psychiatry*. 8 (2017) 42. doi:10.3389/fpsyt.2017.00042.
- [43] T.H. Svensson, α -Adrenoceptor modulation hypothesis of antipsychotic atypicality, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 27 (2003) 1145–1158. doi:10.1016/j.pnpbp.2003.09.009.
- [44] V. Terevnikov, G. Joffe, J.-H. Stenberg, Randomized Controlled Trials of Add-On Antidepressants in Schizophrenia., *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18 (2015). doi:10.1093/ijnp/pyv049.
- [45] S. Miyamoto, G.E. Duncan, C.E. Marx, J.A. Lieberman, Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs, *Mol. Psychiatry*. 10 (2005) 79–104. doi:10.1038/sj.mp.4001556.
- [46] M. Cahir, T. Mawhinney, D.J. King, Differential region-specific regulation of central β 1-adrenoceptor binding following chronic haloperidol and clozapine

- administration in the rat, *Psychopharmacology (Berl)*. 172 (2004) 196–201. doi:10.1007/s00213-003-1639-z.
- [47] K. Maeda, H. Sugino, H. Akazawa, N. Amada, J. Shimada, T. Futamura, H. Yamashita, N. Ito, R.D. McQuade, A. Mork, A.L. Pehrson, M. Hentzer, V. Nielsen, C. Bundgaard, J. Arnt, T.B. Stensbol, T. Kikuchi, Brexpiprazole I: In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Serotonin-Dopamine Activity Modulator, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 350 (2014) 589–604. doi:10.1124/jpet.114.213793.
- [48] C.U. Correll, A. Skuban, M. Hobart, J. Ouyang, E. Weiller, C. Weiss, J.M. Kane, Efficacy of brexpiprazole in patients with acute schizophrenia: Review of three randomized, double-blind, placebo-controlled studies, *Schizophr. Res.* 174 (2016) 82–92. doi:10.1016/j.schres.2016.04.012.
- [49] S. Fryar-Williams, J.E. Strobel, Biomarkers of a five-domain translational substrate for schizophrenia and schizoaffective psychosis, *Biomark. Res.* 3 (2015) 3. doi:10.1186/s40364-015-0028-1.
- [50] V. Terevnikov, J.-H. Stenberg, M. Joffe, J. Tiihonen, M. Burkin, E. Tchoukhine, G. Joffe, More evidence on additive antipsychotic effect of adjunctive mirtazapine in schizophrenia: an extension phase of a randomized controlled trial, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 25 (2010) 431–438. doi:10.1002/hup.1137.
- [51] J.-H. Stenberg, V. Terevnikov, M. Joffe, J. Tiihonen, E. Chukhin, M. Burkin, G. Joffe, Predictors and mediators of add-on mirtazapine-induced cognitive enhancement in schizophrenia – A path model investigation, *Neuropharmacology*. 64 (2013) 248–253. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.06.028.
- [52] N. Müller, Immunological aspects of the treatment of depression and schizophrenia., *Dialogues Clin. Neurosci.* 19 (2017) 55–63.
- [53] S.L. Buka, M.T. Tsuang, E.F. Torrey, M.A. Klebanoff, D. Bernstein, R.H. Yolken, Maternal infections and subsequent psychosis among offspring., *Arch. Gen. Psychiatry*. 58 (2001) 1032–7.
- [54] T. Westergaard, P.B. Mortensen, C.B. Pedersen, J. Wohlfahrt, M. Melbye, Exposure to prenatal and childhood infections and the risk of schizophrenia: suggestions from a study of sibship characteristics and influenza prevalence., *Arch. Gen. Psychiatry*. 56 (1999) 993–8.

- [55] A.S. Brown, P. Cohen, S. Greenwald, E. Susser, Nonaffective Psychosis After Prenatal Exposure to Rubella, *Am. J. Psychiatry.* 157 (2000) 438–443. doi:10.1176/appi.ajp.157.3.438.
- [56] H.J. Sorensen, E.L. Mortensen, J.M. Reinisch, S.A. Mednick, Association Between Prenatal Exposure to Bacterial Infection and Risk of Schizophrenia, *Schizophr. Bull.* 35 (2009) 631–637. doi:10.1093/schbul/sbn121.
- [57] V. Babulas, P. Factor-Litvak, R. Goetz, C.A. Schaefer, A.S. Brown, Prenatal Exposure to Maternal Genital and Reproductive Infections and Adult Schizophrenia, *Am. J. Psychiatry.* 163 (2006) 927–929. doi:10.1176/ajp.2006.163.5.927.
- [58] A.S. Brown, C.A. Schaefer, C.P. Quesenberry, L. Liu, V.P. Babulas, E.S. Susser, Maternal Exposure to Toxoplasmosis and Risk of Schizophrenia in Adult Offspring, *Am. J. Psychiatry.* 162 (2005) 767–773. doi:10.1176/appi.ajp.162.4.767.
- [59] A.S. Brown, J. Hooton, C.A. Schaefer, H. Zhang, E. Petkova, V. Babulas, M. Perrin, J.M. Gorman, E.S. Susser, Elevated Maternal Interleukin-8 Levels and Risk of Schizophrenia in Adult Offspring, *Am. J. Psychiatry.* 161 (2004) 889–895. doi:10.1176/appi.ajp.161.5.889.
- [60] L.M. Ellman, R.F. Deicken, S. Vinogradov, W.S. Kremen, J.H. Poole, D.M. Kern, W.Y. Tsai, C.A. Schaefer, A.S. Brown, Structural brain alterations in schizophrenia following fetal exposure to the inflammatory cytokine interleukin-8, *Schizophr. Res.* 121 (2010) 46–54. doi:10.1016/j.schres.2010.05.014.
- [61] M.E. Benros, P.R. Nielsen, M. Nordentoft, W.W. Eaton, S.O. Dalton, P.B. Mortensen, Autoimmune Diseases and Severe Infections as Risk Factors for Schizophrenia: A 30-Year Population-Based Register Study, *Am. J. Psychiatry.* 168 (2011) 1303–1310. doi:10.1176/appi.ajp.2011.11030516.
- [62] N. Müller, M.J. Schwarz, Immune System and Schizophrenia., *Curr. Immunol. Rev.* 6 (2010) 213–220.
- [63] N. Müller, M. Ackenheil, E. Hofschuster, W. Mempel, R. Eckstein, Cellular immunity in schizophrenic patients before and during neuroleptic treatment., *Psychiatry Res.* 37 (1991) 147–60.
- [64] B.J. Miller, P. Buckley, W. Seabolt, A. Mellor, B. Kirkpatrick, Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects, *Biol. Psychiatry.* 70 (2011) 663–671. doi:10.1016/j.biopsych.2011.04.013.

- [65] N. Müller, M. Riedel, C. Scheppach, B. Brandstätter, S. Sokullu, K. Krampe, M. Ulmschneider, R.R. Engel, H.-J. Möller, M.J. Schwarz, Beneficial Antipsychotic Effects of Celecoxib Add-On Therapy Compared to Risperidone Alone in Schizophrenia, *Am. J. Psychiatry.* 159 (2002) 1029–1034. doi:10.1176/appi.ajp.159.6.1029.
- [66] N. Müller, M. Riedel, M.J. Schwarz, R.R. Engel, Clinical effects of COX-2 inhibitors on cognition in schizophrenia., *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 255 (2005) 149–51. doi:10.1007/s00406-004-0548-4.
- [67] H. Mizoguchi, K. Takuma, A. Fukakusa, Y. Ito, A. Nakatani, D. Ibi, H.-C. Kim, K. Yamada, Improvement by minocycline of methamphetamine-induced impairment of recognition memory in mice, *Psychopharmacology (Berl).* 196 (2008) 233–241. doi:10.1007/s00213-007-0955-0.
- [68] I.B. Chaudhry, J. Hallak, N. Husain, F. Minhas, J. Stirling, P. Richardson, S. Dursun, G. Dunn, B. Deakin, Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment, *J. Psychopharmacol.* 26 (2012) 1185–1193. doi:10.1177/0269881112444941.
- [69] Y. Levkovitz, S. Mendlovich, S. Riwkes, Y. Braw, H. Levkovitch-Verbin, G. Gal, S. Fennig, I. Treves, S. Kron, A Double-Blind, Randomized Study of Minocycline for the Treatment of Negative and Cognitive Symptoms in Early-Phase Schizophrenia, *J. Clin. Psychiatry.* 71 (2010) 138–149. doi:10.4088/JCP.08m04666yel.
- [70] W. Laan, D.E. Grobbee, J.-P. Selten, C.J. Heijnen, R.S. Kahn, H. Burger, Adjuvant Aspirin Therapy Reduces Symptoms of Schizophrenia Spectrum Disorders, *J. Clin. Psychiatry.* 71 (2010) 520–527. doi:10.4088/JCP.09m05117yel.
- [71] L. Grüber, T. Bunse, E. Weidinger, H. Reichard, N. Müller, Adjunctive Recombinant Human Interferon Gamma-1b for Treatment-Resistant Schizophrenia in 2 Patients, *J. Clin. Psychiatry.* 75 (2014) 1266–1267. doi:10.4088/JCP.14l09005.
- [72] T.J. Raedler, F.P. Bymaster, R. Tandon, D. Copolov, B. Dean, Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia, *Mol. Psychiatry.* 12 (2007) 232–246. doi:10.1038/sj.mp.4001924.
- [73] F. Manzella, S.E. Maloney, G.T. Taylor, Smoking in schizophrenic patients: A

- critique of the self-medication hypothesis., *World J. Psychiatry.* 5 (2015) 35–46. doi:10.5498/wjp.v5.i1.35.
- [74] T.L. Wallace, D. Bertrand, Neuronal $\alpha 7$ Nicotinic Receptors as a Target for the Treatment of Schizophrenia, in: *Int. Rev. Neurobiol.*, 2015: pp. 79–111. doi:10.1016/bs.irn.2015.08.003.
- [75] C.E. Adams, K.E. Stevens, Evidence for a role of nicotinic acetylcholine receptors in schizophrenia., *Front. Biosci.* 12 (2007) 4755–72.
- [76] H.O. Kalkman, D. Feuerbach, Modulatory effects of $\alpha 7$ nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 2511–2530. doi:10.1007/s00018-016-2175-4.
- [77] F. Lv, S. Chen, L. Wang, R. Jiang, H. Tian, J. Li, Y. Yao, C. Zhuo, The role of microbiota in the pathogenesis of schizophrenia and major depressive disorder and the possibility of targeting microbiota as a treatment option, *Oncotarget.* 8 (2017) 100899–100907. doi:10.18632/oncotarget.21284.
- [78] E. Fernandez-Espejo, M.-P. Viveros, L. Núñez, B.A. Ellenbroek, F. Rodriguez de Fonseca, Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia, *Psychopharmacology (Berl).* 206 (2009) 531–549. doi:10.1007/s00213-009-1612-6.
- [79] F.E. Emiliani, T.W. Sedlak, A. Sawa, Oxidative stress and schizophrenia, *Curr. Opin. Psychiatry.* 27 (2014) 185–190. doi:10.1097/YCO.0000000000000054.
- [80] J.-H. Cabungcal, P. Steullet, R. Kraftsik, M. Cuenod, K.Q. Do, Early-Life Insults Impair Parvalbumin Interneurons via Oxidative Stress: Reversal by N-Acetylcysteine, *Biol. Psychiatry.* 73 (2013) 574–582. doi:10.1016/j.biopsych.2012.09.020.
- [81] N. Takahashi, T. Sakurai, K.L. Davis, J.D. Buxbaum, Linking oligodendrocyte and myelin dysfunction to neurocircuitry abnormalities in schizophrenia, *Prog. Neurobiol.* 93 (2011) 13–24. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.09.004.
- [82] L.J. Siever, K.L. Davis, The Pathophysiology of Schizophrenia Disorders: Perspectives From the Spectrum, *Am. J. Psychiatry.* 161 (2004) 398–413. doi:10.1176/appi.ajp.161.3.398.
- [83] L Crismon, TR Argo, PF Buckley, Schizophrenia. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, et al., editors. *1Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach.* 9th ed, New York: McGraw-Hill, New York, 2014.
- [84] J.M. Kane, Pharmacologic treatment of schizophrenia., *Biol. Psychiatry.* 46

- (1999) 1396–408.
- [85] J. van Os, S. Kapur, Schizophrenia, *Lancet*. 374 (2009) 635–645. doi:10.1016/S0140-6736(09)60995-8.
- [86] P. Stępnicki, M. Kondej, A.A. Kaczor, Current Concepts and Treatments of Schizophrenia, *Molecules*. 23 (2018) 2087. doi:10.3390/molecules23082087.
- [87] N.P. Maric, M.J. Jovicic, M. Mihaljevic, C. Miljevic, Improving Current Treatments for Schizophrenia, *Drug Dev. Res.* 77 (2016) 357–367. doi:10.1002/ddr.21337.
- [88] M Rzewuska, *Nowe i atypowe leki przeciwpsychotyczne*, Warszawa, 1996.
- [89] J. Delay, P. Deniker, R. Ropert, Four years of experience with chlorpromazine in therapy of psychoses., *Presse Med.* 64 (1956) 493–6.
- [90] J. Crilly, The history of clozapine and its emergence in the US market, *Hist. Psychiatry*. 18 (2007) 39–60. doi:10.1177/0957154X07070335.
- [91] J.-P. Zhang, J.A. Gallego, D.G. Robinson, A.K. Malhotra, J.M. Kane, C.U. Correll, Efficacy and safety of individual second-generation vs. first-generation antipsychotics in first-episode psychosis: a systematic review and meta-analysis, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16 (2013) 1205–1218. doi:10.1017/S1461145712001277.
- [92] M. Solmi, A. Murru, I. Pacchiarotti, J. Undurraga, N. Veronese, M. Fornaro, B. Stubbs, F. Monaco, E. Vieta, M. Seeman, C. Correll, A. Carvalho, Safety, tolerability, and risks associated with first- and second-generation antipsychotics: a state-of-the-art clinical review, *Ther. Clin. Risk Manag.* Volume 13 (2017) 757–777. doi:10.2147/TCRM.S117321.
- [93] C. Deng, Effects of Antipsychotic Medications on Appetite, Weight, and Insulin Resistance, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 42 (2013) 545–563. doi:10.1016/j.ecl.2013.05.006.
- [94] S. Butini, S. Gemma, G. Campiani, S. Franceschini, F. Trotta, M. Borriello, N. Ceres, S. Ros, S.S. Coccone, M. Bernetti, M. De Angelis, M. Brindisi, V. Nacci, I. Fiorini, E. Novellino, A. Cagnotto, T. Mennini, K. Sandager-Nielsen, J.T. Andreasen, J. Scheel-Kruger, J.D. Mikkelsen, C. Fattorusso, Discovery of a New Class of Potential Multifunctional Atypical Antipsychotic Agents Targeting Dopamine D₃ and Serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptors: Design, Synthesis, and Effects on Behavior, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 151–169. doi:10.1021/jm800689g.

- [95] S Stahl, *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*, 4th ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2013.
- [96] C.A. Tamminga, Partial dopamine agonists in the treatment of psychosis, *J. Neural Transm.* 109 (2002) 411–420. doi:10.1007/s007020200033.
- [97] R.B. Mailman, V. Murthy, Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity?, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 488–501.
- [98] J.A. Lieberman, Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic., *CNS Drugs.* 18 (2004) 251–67.
- [99] L. Citrome, Emerging pharmacological therapies in schizophrenia: what's new, what's different, what's next?, *CNS Spectr.* 21 (2016) 1–12. doi:10.1017/S1092852916000729.
- [100] L. Citrome, The ABC's of dopamine receptor partial agonists - aripiprazole, brexpiprazole and cariprazine: the 15-min challenge to sort these agents out, *Int. J. Clin. Pract.* 69 (2015) 1211–1220. doi:10.1111/ijcp.12752.
- [101] J.S. Frankel, T.L. Schwartz, Brexpiprazole and cariprazine: distinguishing two new atypical antipsychotics from the original dopamine stabilizer aripiprazole., *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 7 (2017) 29–41. doi:10.1177/2045125316672136.
- [102] L. Citrome, T.B. Stensbøl, K. Maeda, The preclinical profile of brexpiprazole: what is its clinical relevance for the treatment of psychiatric disorders?, *Expert Rev. Neurother.* 15 (2015) 1219–1229. doi:10.1586/14737175.2015.1086269.
- [103] B. Kiss, A. Horvath, Z. Nemethy, E. Schmidt, I. Laszlovszky, G. Bugovics, K. Fazekas, K. Hornok, S. Orosz, I. Gyertyan, E. Agai-Csongor, G. Domany, K. Tihanyi, N. Adham, Z. Szombathelyi, Cariprazine (RGH-188), a Dopamine D3 Receptor-Preferring, D3/D2 Dopamine Receptor Antagonist-Partial Agonist Antipsychotic Candidate: In Vitro and Neurochemical Profile, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333 (2010) 328–340. doi:10.1124/jpet.109.160432.
- [104] R. Zimnisky, G. Chang, I. Gyertyán, B. Kiss, N. Adham, C. Schmauss, Cariprazine, a dopamine D(3)-receptor-preferring partial agonist, blocks phencyclidine-induced impairments of working memory, attention set-shifting, and recognition memory in the mouse., *Psychopharmacology (Berl.)* 226 (2013) 91–100. doi:10.1007/s00213-012-2896-5.
- [105] L. Citrome, Cariprazine for the Treatment of Schizophrenia: A Review of this Dopamine D3-Preferring D3/D2 Receptor Partial Agonist, *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses.* 10 (2016) 109–119. doi:10.3371/1935-1232-10.2.109.

- [106] L. Citrome, Brexpiprazole for schizophrenia and as adjunct for major depressive disorder: a systematic review of the efficacy and safety profile for this newly approved antipsychotic - what is the number needed to treat, number needed to harm and likelihood to be hel, *Int. J. Clin. Pract.* 69 (2015) 978–997. doi:10.1111/ijcp.12714.
- [107] J.A. Lieberman, R.E. Davis, C.U. Correll, D.C. Goff, J.M. Kane, C.A. Tamminga, S. Mates, K.E. Vanover, ITI-007 for the Treatment of Schizophrenia: A 4-Week Randomized, Double-Blind, Controlled Trial, *Biol. Psychiatry*. 79 (2016) 952–961. doi:10.1016/j.biopsych.2015.08.026.
- [108] G.L. Snyder, K.E. Vanover, H. Zhu, D.B. Miller, J.P. O’Callaghan, J. Tomesch, P. Li, Q. Zhang, V. Krishnan, J.P. Hendrick, E.J. Nestler, R.E. Davis, L.P. Wennogle, S. Mates, Functional profile of a novel modulator of serotonin, dopamine, and glutamate neurotransmission, *Psychopharmacology (Berl)*. 232 (2015) 605–621. doi:10.1007/s00213-014-3704-1.
- [109] R.E. Davis, C.U. Correll, ITI-007 in the treatment of schizophrenia: from novel pharmacology to clinical outcomes, *Expert Rev. Neurother.* 16 (2016) 601–614. doi:10.1080/14737175.2016.1174577.
- [110] RE Davis, KE Vanover, C O’Gorman, et. al., ITI-007 for the treatment of schizophrenia: primary & secondary efficacy endpoints and subgroup analyses from two positive randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials, in: Presented at: American Psychiatric Association Annual Meeting, Atlanta GA, 2016: p. Poster presentation P6-146.
- [111] Intra-Cellular Therapies, 2016.
- [112] J.M. Kane, Tardive Dyskinesia Circa 2006, *Am. J. Psychiatry*. 163 (2006) 1316–1318. doi:10.1176/ajp.2006.163.8.1316.
- [113] H.C. Margolese, G. Chouinard, T.T. Kolivakis, L. Beauclair, R. Miller, Tardive Dyskinesia in the Era of Typical and Atypical Antipsychotics. Part 1: Pathophysiology and Mechanisms of Induction, *Can. J. Psychiatry*. 50 (2005) 541–547. doi:10.1177/070674370505000907.
- [114] H.C. Margolese, G. Chouinard, T.T. Kolivakis, L. Beauclair, R. Miller, L. Annable, Tardive Dyskinesia in the Era of Typical and Atypical Antipsychotics. Part 2: Incidence and Management Strategies in Patients with Schizophrenia, *Can. J. Psychiatry*. 50 (2005) 703–714. doi:10.1177/070674370505001110.
- [115] J.G. Leung, E.L. Breden, Tetrabenazine for the Treatment of Tardive Dyskinesia,

- Ann. Pharmacother. 45 (2011) 525–531. doi:10.1345/aph.1P312.
- [116] F.M. Leweke, J.K. Mueller, B. Lange, C. Rohleder, Therapeutic Potential of Cannabinoids in Psychosis, *Biol. Psychiatry*. 79 (2016) 604–612. doi:10.1016/j.biopsych.2015.11.018.
- [117] P. Seeman, Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose, *Transl. Psychiatry*. 6 (2016) e920–e920. doi:10.1038/tp.2016.195.
- [118] I.D. Henter, R.T. de Sousa, P.W. Gold, A.R. Brunoni, C.A. Zarate, R. Machado-Vieira, Mood Therapeutics: Novel Pharmacological Approaches for Treating Depression, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 10 (2017) 153–166. doi:10.1080/17512433.2017.1253472.
- [119] S.S. Shim, M.D. Hammonds, B.S. Kee, Potentiation of the NMDA receptor in the treatment of schizophrenia: focused on the glycine site, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 258 (2007) 16–27. doi:10.1007/s00406-007-0757-8.
- [120] B.J. Kinon, B.A. Millen, L. Zhang, D.L. McKinzie, Exploratory Analysis for a Targeted Patient Population Responsive to the Metabotropic Glutamate 2/3 Receptor Agonist Pomaglumetad Methionil in Schizophrenia, *Biol. Psychiatry*. 78 (2015) 754–762. doi:10.1016/j.biopsych.2015.03.016.
- [121] K. Hashimoto, B. Malchow, P. Falkai, A. Schmitt, Glutamate modulators as potential therapeutic drugs in schizophrenia and affective disorders, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 263 (2013) 367–377. doi:10.1007/s00406-013-0399-y.
- [122] D.R. Sibley, F.J. Monsma, Molecular biology of dopamine receptors., *Trends Pharmacol. Sci.* 13 (1992) 61–9.
- [123] L. Shi, J.A. Javitch, The binding site of aminergic G protein - coupled receptors: The Transmembrane Segments and Second Extracellular Loop, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002) 437–467. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.091101.144224.
- [124] G.M. Leggio, C. Bucolo, C.B.M. Platania, S. Salomone, F. Drago, Current drug treatments targeting dopamine D3 receptor, *Pharmacol. Ther.* 165 (2016) 164–177. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.06.007.
- [125] P. De Deurwaerdère, Cariprazine: New dopamine biased agonist for neuropsychiatric disorders, *Drugs of Today*. 52 (2016) 97. doi:10.1358/dot.2016.52.2.2461868.
- [126] E. Ceskova, P. Silhan, Novel treatment options in depression and psychosis.,

- Neuropsychiatr. Dis. Treat. 14 (2018) 741–747. doi:10.2147/NDT.S157475.
- [127] M.P. Cruz, Aripiprazole Lauroxil (Aristada): An Extended-Release, Long-Acting Injection For the Treatment of Schizophrenia., *P T.* 41 (2016) 556–9.
- [128] A.J. Savitz, H. Xu, S. Gopal, I. Nuamah, P. Ravenstijn, A. Janik, A. Schotte, D. Hough, W.W. Fleischhacker, Efficacy and Safety of Paliperidone Palmitate 3-Month Formulation for Patients with Schizophrenia: A Randomized, Multicenter, Double-Blind, Noninferiority Study, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19 (2016) pyw018. doi:10.1093/ijnp/pyw018.
- [129] Alkermes, Alkermes submits supplemental new drug application to FDA for two-month dosing option of ARISTADA® for treatment of schizophrenia., 2016.
- [130] A.F. Nasser, D.C. Henderson, M. Fava, P.J. Fudala, P. Twumasi-Ankrah, A. Kouassi, C. Heidbreder, Efficacy, Safety, and Tolerability of RBP-7000 Once-Monthly Risperidone for the Treatment of Acute Schizophrenia, *J. Clin. Psychopharmacol.* 36 (2016) 130–140. doi:10.1097/JCP.0000000000000479.
- [131] C.R. Krynicki, R. Upthegrove, J.F.W. Deakin, T.R.E. Barnes, The relationship between negative symptoms and depression in schizophrenia: a systematic review, *Acta Psychiatr. Scand.* 137 (2018) 380–390. doi:10.1111/acps.12873.
- [132] R. Upthegrove, S. Marwaha, M. Birchwood, Depression and Schizophrenia: Cause, Consequence or Trans-diagnostic Issue?, *Schizophr. Bull.* 43 (2016) sbw097. doi:10.1093/schbul/sbw097.
- [133] M. Birchwood, Z. Iqbal, R. Upthegrove, Psychological pathways to depression in schizophrenia, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 255 (2005) 202–212. doi:10.1007/s00406-005-0588-4.
- [134] G. Catone, S. Marwaha, E. Kuipers, B. Lennox, D. Freeman, P. Bebbington, M. Broome, Bullying victimisation and risk of psychotic phenomena: analyses of British national survey data, *The Lancet Psychiatry.* 2 (2015) 618–624. doi:10.1016/S2215-0366(15)00055-3.
- [135] R.R. Conley, H. Ascher-Svanum, B. Zhu, D.E. Faries, B.J. Kinon, The burden of depressive symptoms in the long-term treatment of patients with schizophrenia., *Schizophr. Res.* 90 (2007) 186–97. doi:10.1016/j.schres.2006.09.027.
- [136] H. Häfner, K. Maurer, G. Trendler, W. an der Heiden, M. Schmidt, R. Könnecke, Schizophrenia and depression: Challenging the paradigm of two separate diseases—A controlled study of schizophrenia, depression and healthy controls, *Schizophr. Res.* 77 (2005) 11–24. doi:10.1016/j.schres.2005.01.004.

- [137] P.F. Buckley, B.J. Miller, D.S. Lehrer, D.J. Castle, Psychiatric Comorbidities and Schizophrenia, *Schizophr. Bull.* 35 (2009) 383–402. doi:10.1093/schbul/sbn135.
- [138] C. Whitehead, S. Moss, A. Cardno, G. Lewis, V.A. Furtado, Antidepressants for people with both schizophrenia and depression, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2002) CD002305. doi:10.1002/14651858.CD002305.
- [139] G.D. Tollefson, S.W. Andersen, P. V Tran, The course of depressive symptoms in predicting relapse in schizophrenia: a double-blind, randomized comparison of olanzapine and risperidone., *Biol. Psychiatry.* 46 (1999) 365–73.
- [140] G. Reine, C. Lançon, S. Di Tucci, C. Sapin, P. Auquier, Depression and subjective quality of life in chronic phase schizophrenic patients., *Acta Psychiatr. Scand.* 108 (2003) 297–303.
- [141] S. Saha, D. Chant, J. McGrath, A Systematic Review of Mortality in Schizophrenia, *Arch. Gen. Psychiatry.* 64 (2007) 1123. doi:10.1001/archpsyc.64.10.1123.
- [142] S.G. Siris, D. Addington, J.M. Azorin, I.R. Falloon, J. Gerlach, S.R. Hirsch, Depression in schizophrenia: recognition and management in the USA., *Schizophr. Res.* 47 (2001) 185–97.
- [143] A. Gregory, P. Mallikarjun, R. Upthegrove, Treatment of depression in schizophrenia: Systematic review and meta-analysis, *Br. J. Psychiatry.* 211 (2017) 198–204. doi:10.1192/bjp.bp.116.190520.
- [144] V. Terevnikov, J.-H. Stenberg, G. Joffe, Should patients with schizophrenia receive antidepressants?, *Duodecim.* 133 (2017) 465–71.
- [145] C. Rummel-Kluge, W. Kissling, S. Leucht, Antidepressants for the negative symptoms of schizophrenia, in: C. Rummel-Kluge (Ed.), *Cochrane Database Syst. Rev.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2006: p. CD005581. doi:10.1002/14651858.CD005581.pub2.
- [146] B. Helfer, M.T. Samara, M. Huhn, E. Klupp, C. Leucht, Y. Zhu, R.R. Engel, S. Leucht, Efficacy and Safety of Antidepressants Added to Antipsychotics for Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Am. J. Psychiatry.* 173 (2016) 876–886. doi:10.1176/appi.ajp.2016.15081035.
- [147] M. Buonocore, M. Bosia, M. Bechi, M. Spangaro, S. Cavedoni, F. Cocchi, L. Bianchi, C. Guglielmino, A.R. Mastromatteo, R. Cavallaro, Targeting anxiety to improve quality of life in patients with schizophrenia, *Eur. Psychiatry.* 45 (2017) 129–135. doi:10.1016/j.eurpsy.2017.06.014.

- [148] P. Tibbo, J. Swainson, P. Chue, J.-M. LeMelledo, Prevalence and relationship to delusions and hallucinations of anxiety disorders in schizophrenia, *Depress. Anxiety*. 17 (2003) 65–72. doi:10.1002/da.10083.
- [149] A. Bulbena, L. Sperry, B. Anguiano, G. Pailhez, J. Gago, Joint Hypermobility in Schizophrenia: A Potential Marker for Co-Morbid Anxiety, *Open Psychiatr. J.* 1 (2007) 31–33. doi:10.2174/1874354400701010031.
- [150] R.J. Braga, G. Petrides, I. Figueira, Anxiety disorders in schizophrenia, *Compr. Psychiatry*. 45 (2004) 460–468. doi:10.1016/j.comppsy.2004.07.009.
- [151] R.J. Braga, G.P. Reynolds, S.G. Siris, Anxiety comorbidity in schizophrenia, *Psychiatry Res.* 210 (2013) 1–7. doi:10.1016/j.psychres.2013.07.030.
- [152] K.M. Lowengrub, R. Stryjer, M. Birger, I. Iancu, Social Anxiety Disorder Comorbid with Schizophrenia: The Importance of Screening for This Under recognized and Under treated Condition., *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 52 (2015) 40–5.
- [153] S. Pallanti, A. Cantisani, G. Grassi, Anxiety as a Core Aspect of Schizophrenia, *Curr. Psychiatry Rep.* 15 (2013) 354. doi:10.1007/s11920-013-0354-7.
- [154] A.M. Achim, M. Maziade, E. Raymond, D. Olivier, C. Mérette, M.-A. Roy, How prevalent are anxiety disorders in schizophrenia? A meta-analysis and critical review on a significant association., *Schizophr. Bull.* 37 (2011) 811–21. doi:10.1093/schbul/sbp148.
- [155] M.Z. Dernovsek, L. Sprah, Comorbid anxiety in patients with psychosis., *Psychiatr. Danub.* 21 Suppl 1 (2009) 43–50.
- [156] R.M. Norman, A.K. Malla, L. Cortese, F. Diaz, Aspects of dysphoria and symptoms of schizophrenia., *Psychol. Med.* 28 (1998) 1433–41.
- [157] S.G. Siris, Depression in schizophrenia: perspective in the era of ‘Atypical’ antipsychotic agents., *Am. J. Psychiatry*. 157 (2000) 1379–89. doi:10.1176/appi.ajp.157.9.1379.
- [158] J.D. Huppert, K.A. Weiss, R. Lim, S. Pratt, T.E. Smith, Quality of life in schizophrenia: contributions of anxiety and depression., *Schizophr. Res.* 51 (2001) 171–80.
- [159] M. Buonocore, M. Bosia, M.A. Baraldi, M. Bechi, M. Spangaro, F. Cocchi, L. Bianchi, C. Guglielmino, A.R. Mastromatteo, R. Cavallaro, Exploring anxiety in schizophrenia: New light on a hidden figure, *Psychiatry Res.* 268 (2018) 312–316. doi:10.1016/j.psychres.2018.07.039.

- [160] A Bulbena, B Anguiano, J Gago, E Basterreche, J Ballesteros, I Eguiluz, et al., Panic/phobic anxiety in schizophrenia: a positive association with joint hypermobility syndrome., *Neurol Psychiatry Brain Res.* 12 (2005) 95–100.
- [161] A. Bulbena-Cabre, A. Bulbena, Schizophrenia and anxiety: yes, they are relatives not just neighbours, *Br. J. Psychiatry.* 213 (2018) 498–498. doi:10.1192/bjp.2018.126.
- [162] M. Michail, M. Birchwood, Social anxiety disorder and shame cognitions in psychosis, *Psychol. Med.* 43 (2013) 133–142. doi:10.1017/S0033291712001146.
- [163] T. Taiminen, J. Huttunen, H. Heilä, M. Henriksson, E. Isometsä, J. Kähkönen, K. Tuominen, J. Lönnqvist, D. Addington, H. Helenius, The Schizophrenia Suicide Risk Scale (SSRS): development and initial validation., *Schizophr. Res.* 47 (2001) 199–213.
- [164] J.J. Blanchard, K.T. Mueser, A.S. Bellack, Anhedonia, positive and negative affect, and social functioning in schizophrenia., *Schizophr. Bull.* 24 (1998) 413–24.
- [165] R.J. Braga, M. V. Mendlowicz, R.P. Marrocos, I.L. Figueira, Anxiety disorders in outpatients with schizophrenia: prevalence and impact on the subjective quality of life, *J. Psychiatr. Res.* 39 (2005) 409–414. doi:10.1016/j.jpsychires.2004.09.003.
- [166] S. Pallanti, L. Quercioli, E. Hollander, Social Anxiety in Outpatients With Schizophrenia: A Relevant Cause of Disability, *Am. J. Psychiatry.* 161 (2004) 53–58. doi:10.1176/appi.ajp.161.1.53.
- [167] P. Kingsep, P. Nathan, D. Castle, Cognitive behavioural group treatment for social anxiety in schizophrenia., *Schizophr. Res.* 63 (2003) 121–9.
- [168] S. Pallanti, L. Quercioli, A. Rossi, A. Pazzagli, The emergence of social phobia during clozapine treatment and its response to fluoxetine augmentation., *J. Clin. Psychiatry.* 60 (1999) 819–23.
- [169] N. Argyle, Panic attacks in chronic schizophrenia., *Br. J. Psychiatry.* 157 (1990) 430–3.
- [170] J. Hall, Schizophrenia — an anxiety disorder?, *Br. J. Psychiatry.* 211 (2017) 262–263. doi:10.1192/bjp.bp.116.195370.
- [171] A. Reichenberg, M. Weiser, A. Caspi, H.Y. Knobler, G. Lubin, P.D. Harvey, J. Rabinowitz, M. Davidson, Premorbid Intellectual Functioning and Risk of Schizophrenia and Spectrum Disorders, *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 28 (2006)

- 193–207. doi:10.1080/13803390500360372.
- [172] R.W. Heinrichs, The Primacy of Cognition in Schizophrenia., *Am. Psychol.* 60 (2005) 229–242. doi:10.1037/0003-066X.60.3.229.
- [173] B. Cornblatt, M. Obuchowski, S. Roberts, S. Pollack, L. Erlenmeyer-Kimling, Cognitive and behavioral precursors of schizophrenia., *Dev. Psychopathol.* 11 (1999) 487–508.
- [174] T.A. Niendam, C.E. Bearden, I.M. Rosso, L.E. Sanchez, T. Hadley, K.H. Nuechterlein, T.D. Cannon, A Prospective Study of Childhood Neurocognitive Functioning in Schizophrenic Patients and Their Siblings, *Am. J. Psychiatry.* 160 (2003) 2060–2062. doi:10.1176/appi.ajp.160.11.2060.
- [175] C.-Y. Lin, G.E. Tsai, H.-Y. Lane, Assessing and treating cognitive impairment in schizophrenia: current and future., *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 5127–38.
- [176] J. Peuskens, C. Demily, F. Thibaut, Treatment of cognitive dysfunction in schizophrenia, *Clin. Ther.* 27 (2005) S25–S37. doi:10.1016/j.clinthera.2005.07.015.
- [177] A. Prouteau, H. Verdoux, C. Briand, A. Lesage, P. Lalonde, L. Nicole, D. Reinharz, E. Stip, Cognitive predictors of psychosocial functioning outcome in schizophrenia: A follow-up study of subjects participating in a rehabilitation program, *Schizophr. Res.* 77 (2005) 343–353. doi:10.1016/j.schres.2005.03.001.
- [178] E.Y.-H. Chen, C.L.-M. Hui, E.L.-W. Dunn, M.Y.-K. Miao, W.-S. Yeung, C.-K. Wong, W.-F. Chan, W.-N. Tang, A prospective 3-year longitudinal study of cognitive predictors of relapse in first-episode schizophrenic patients, *Schizophr. Res.* 77 (2005) 99–104. doi:10.1016/j.schres.2005.02.020.
- [179] R.S.E. Keefe, W.S. Fenton, How should DSM-V criteria for schizophrenia include cognitive impairment?, *Schizophr. Bull.* 33 (2007) 912–20. doi:10.1093/schbul/sbm046.
- [180] S. Heckers, Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia, *Hippocampus.* 11 (2001) 520–528. doi:10.1002/hipo.1068.
- [181] A. Reichenberg, P.D. Harvey, Neuropsychological impairments in schizophrenia: Integration of performance-based and brain imaging findings., *Psychol. Bull.* 133 (2007) 833–858. doi:10.1037/0033-2909.133.5.833.
- [182] M.J. Minzenberg, A.R. Laird, S. Thelen, C.S. Carter, D.C. Glahn, Meta-analysis of 41 Functional Neuroimaging Studies of Executive Function in Schizophrenia, *Arch. Gen. Psychiatry.* 66 (2009) 811. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.91.

- [183] J.M. Gold, R.W. Goldberg, S.W. McNary, L.B. Dixon, A.F. Lehman, Cognitive Correlates of Job Tenure Among Patients With Severe Mental Illness, *Am. J. Psychiatry*. 159 (2002) 1395–1402. doi:10.1176/appi.ajp.159.8.1395.
- [184] M.F. Green, R.S. Kern, R.K. Heaton, Longitudinal studies of cognition and functional outcome in schizophrenia: implications for MATRICS, *Schizophr. Res.* 72 (2004) 41–51. doi:10.1016/j.schres.2004.09.009.
- [185] J.A. Gray, B.L. Roth, Molecular Targets for Treating Cognitive Dysfunction in Schizophrenia, *Schizophr. Bull.* 33 (2007) 1100–1119. doi:10.1093/schbul/sbm074.
- [186] R.W. Buchanan, R. Freedman, D.C. Javitt, A. Abi-Dargham, J.A. Lieberman, Recent advances in the development of novel pharmacological agents for the treatment of cognitive impairments in schizophrenia., *Schizophr. Bull.* 33 (2007) 1120–30. doi:10.1093/schbul/sbm083.
- [187] C.A. Tamminga, The neurobiology of cognition in schizophrenia., *J. Clin. Psychiatry*. 67 (2006) e11.
- [188] H.M. Ibrahim, C.A. Tamminga, Treating impaired cognition in schizophrenia., *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (2012) 1587–94.
- [189] C. Galletly, Recent advances in treating cognitive impairment in schizophrenia, *Psychopharmacology (Berl)*. 202 (2009) 259–273. doi:10.1007/s00213-008-1302-9.
- [190] D.C. Goff, M. Hill, D. Barch, The treatment of cognitive impairment in schizophrenia, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99 (2011) 245–253. doi:10.1016/j.pbb.2010.11.009.
- [191] S. Kasper, E. Resinger, Cognitive effects and antipsychotic treatment., *Psychoneuroendocrinology*. 28 Suppl 1 (2003) 27–38.
- [192] T.E. Goldberg, R.S. Goldman, K.E. Burdick, A.K. Malhotra, T. Lencz, R.C. Patel, M.G. Woerner, N.R. Schooler, J.M. Kane, D.G. Robinson, Cognitive improvement after treatment with second-generation antipsychotic medications in first-episode schizophrenia: is it a practice effect?, *Arch. Gen. Psychiatry*. 64 (2007) 1115–22. doi:10.1001/archpsyc.64.10.1115.
- [193] N.A. Buckley, P. Sanders, Cardiovascular adverse effects of antipsychotic drugs., *Drug Saf.* 23 (2000) 215–28.
- [194] K.G. Kahl, M. Westhoff-Bleck, T.H.C. Krüger, Effects of psychopharmacological treatment with antipsychotic drugs on the vascular

- system., *Vascul. Pharmacol.* 100 (2018) 20–25. doi:10.1016/j.vph.2017.09.001.
- [195] C. Polcwiartek, K. Kragholm, O. Schjerning, C. Graff, J. Nielsen, Cardiovascular safety of antipsychotics: a clinical overview, *Expert Opin. Drug Saf.* 15 (2016) 1–10. doi:10.1517/14740338.2016.1161021.
- [196] M.T. Blom, D. Cohen, A. Seldenrijk, B.W.J.H. Penninx, G. Nijpels, C.D.A. Stehouwer, J.M. Dekker, H.L. Tan, Brugada Syndrome ECG Is Highly Prevalent in Schizophrenia, *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* 7 (2014) 384–391. doi:10.1161/CIRCEP.113.000927.
- [197] K.G. Jensen, K. Juul, A. Fink-Jensen, C.U. Correll, A.K. Pagsberg, Corrected QT Changes During Antipsychotic Treatment of Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 54 (2015) 25–36. doi:10.1016/j.jaac.2014.10.002.
- [198] F. De Yang, X.Q. Wang, X.P. Liu, K.X. Zhao, W.H. Fu, X.R. Hao, X.L. Zhang, G.S. Huang, S.C. Qu, J.S. Bai, X.F. Huang, T.R. Kosten, X.Y. Zhang, Sex difference in QTc prolongation in chronic institutionalized patients with schizophrenia on long-term treatment with typical and atypical antipsychotics, *Psychopharmacology (Berl).* 216 (2011) 9–16. doi:10.1007/s00213-011-2188-5.
- [199] C. Barbui, I. Bighelli, G. Carrà, M. Castellazzi, C. Lucii, G. Martinotti, M. Nosè, G. Ostuzzi, STAR NETWORK INVESTIGATORS, Antipsychotic Dose Mediates the Association between Polypharmacy and Corrected QT Interval, *PLoS One.* 11 (2016) e0148212. doi:10.1371/journal.pone.0148212.
- [200] S. Leucht, A. Cipriani, L. Spineli, D. Mavridis, D. Örey, F. Richter, M. Samara, C. Barbui, R.R. Engel, J.R. Geddes, W. Kissling, M.P. Stapf, B. Lässig, G. Salanti, J.M. Davis, Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis, *Lancet.* 382 (2013) 951–962. doi:10.1016/S0140-6736(13)60733-3.
- [201] W.S. Aronow, T.A. Shamliyan, Effects of atypical antipsychotic drugs on QT interval in patients with mental disorders., *Ann. Transl. Med.* 6 (2018) 147. doi:10.21037/atm.2018.03.17.
- [202] M. Shulman, A. Miller, J. Misher, A. Tentler, Managing cardiovascular disease risk in patients treated with antipsychotics: a multidisciplinary approach, *J. Multidiscip. Healthc.* 7 (2014) 489. doi:10.2147/JMDH.S49817.
- [203] A.A. Shah, A. Aftab, John Coverdale, QTc Prolongation with Antipsychotics: is routine ECG monitoring recommended?, *J. Psychiatr. Pract.* 20 (2014) 196–206.

- doi:10.1097/01.pra.0000450319.21859.6d.
- [204] J.J. Gugger, Antipsychotic Pharmacotherapy and Orthostatic Hypotension, *CNS Drugs*. 25 (2011) 659–671. doi:10.2165/11591710-000000000-00000.
- [205] Z. Nourian, T. Mow, D. Muftic, S. Burek, M.L. Pedersen, J. Matz, M.J. Mulvany, Orthostatic hypotensive effect of antipsychotic drugs in Wistar rats by in vivo and in vitro studies of α 1-adrenoceptor function, *Psychopharmacology (Berl)*. 199 (2008) 15–27. doi:10.1007/s00213-007-1064-9.
- [206] P.M. Haddad, S.G. Sharma, Adverse effects of atypical antipsychotics : differential risk and clinical implications., *CNS Drugs*. 21 (2007) 911–36.
- [207] B.M. Nilsson, O. Edström, L. Lindström, P. Wernegren, R. Bodén, Tachycardia in patients treated with clozapine versus antipsychotic long-acting injections, *Int. Clin. Psychopharmacol*. 32 (2017) 219–224. doi:10.1097/YIC.000000000000169.
- [208] T. Oner, C. Akdeniz, H. Adaletli, Multifocal atrial tachycardia caused by risperidone, *Int. J. Cardiol*. 203 (2016) 855–857. doi:10.1016/j.ijcard.2015.10.234.
- [209] J.A. Lieberman, G.D. Tollefson, C. Charles, R. Zipursky, T. Sharma, R.S. Kahn, R.S.E. Keefe, A.I. Green, R.E. Gur, J. McEvoy, D. Perkins, R.M. Hamer, H. Gu, M. Tohen, HGDH Study Group, Antipsychotic Drug Effects on Brain Morphology in First-Episode Psychosis, *Arch. Gen. Psychiatry*. 62 (2005) 361. doi:10.1001/archpsyc.62.4.361.
- [210] M.J. Millan, Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)(1A) receptors., *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 295 (2000) 853–61.
- [211] O. Agid, S. Kapur, G. Remington, Emerging drugs for schizophrenia., *Expert Opin. Emerg. Drugs*. 13 (2008) 479–95. doi:10.1517/14728214.13.3.479.
- [212] H.Y. Meltzer, T. Sumiyoshi, Does stimulation of 5-HT1A receptors improve cognition in schizophrenia?, *Behav. Brain Res*. 195 (2008) 98–102. doi:10.1016/j.bbr.2008.05.016.
- [213] A. Wesółowska, Potential role of the 5-HT6 receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data., *Pharmacol. Rep*. 62 (2010) 564–577.
- [214] B.G. Sundar, T.R. Bailey, D.D. Dunn, E.R. Bacon, J.M. Salvino, G.C. Morton, L.D. Aimone, H. Zeqi, J.R. Mathiasen, A. Dicamillo, M.J. Huffman, B.A. McKenna, K. Kopec, L.D. Lu, R. Brown, J. Qian, T. Angeles, T. Connors, C. Spais, B. Holskin, D. Galinis, E. Duzic, H. Schaffhauser, G.C. Rosse, Novel

- brain penetrant benzofuoropiperidine 5-HT₆ receptor antagonists., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 120–3. doi:10.1016/j.bmcl.2011.11.050.
- [215] A. Wesołowska, A. Nikiforuk, K. Stachowicz, Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats, *Eur. J. Pharmacol.* 553 (2006) 185–190. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.064.
- [216] A. Wesołowska, E. Tatarczyńska, A. Nikiforuk, E. Chojnacka-Wójcik, Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 555 (2007) 43–47. doi:10.1016/j.ejphar.2006.10.001.
- [217] A. Anighoro, J. Bajorath, G. Rastelli, Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 7874–7887. doi:10.1021/jm5006463.
- [218] B.L. Roth, D.J. Sheffler, W.K. Kroeze, Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia., *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 353–9. doi:10.1038/nrd1346.
- [219] S.O. Ogren, H. Hall, C. Köhler, O. Magnusson, S.E. Sjöstrand, The selective dopamine D₂ receptor antagonist raclopride discriminates between dopamine-mediated motor functions., *Psychopharmacology (Berl)*. 90 (1986) 287–94.
- [220] J.T. Litchfield, F. Wilcoxon, A simplified method of evaluating dose-effect experiments., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96 (1949) 99–113.
- [221] Y. Cheng, W.H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction., *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3099–108.
- [222] M. Irifune, T. Shimizu, M. Nomoto, T. Fukuda, Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51 (n.d.) 291–6.
- [223] P. Zajdel, K. Marciniak, A. Maślankiewicz, G. Satała, B. Duszyńska, A.J. Bojarski, A. Partyka, M. Jastrzębska-Więsek, D. Wróbel, A. Wesołowska, M. Pawłowski, Quinoline- and isoquinoline-sulfonamide derivatives of LCAP as potent CNS multi-receptor—5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ and D₂/D₃/D₄—agents: The synthesis and pharmacological evaluation, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 1545–1556. doi:10.1016/j.bmc.2011.12.039.
- [224] M.F. O'Neill, C.L. Heron-Maxwell, G. Shaw, 5-HT₂ receptor antagonism

- reduces hyperactivity induced by amphetamine, cocaine, and MK-801 but not D1 agonist C-APB., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63 (1999) 237–43.
- [225] G. Chłoń-Rzepa, A. Bucki, M. Kołaczkowski, A. Partyka, M. Jastrzębska-Więsek, G. Satała, A.J. Bojarski, J. Kalinowska-Tłuścik, G. Kazek, B. Mordyl, M. Głuch-Lutwin, A. Wesołowska, Arylpiperazinylalkyl derivatives of 8-amino-1,3-dimethylpurine-2,6-dione as novel multitarget 5-HT/D receptor agents with potential antipsychotic activity., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31 (2016) 1048–62. doi:10.3109/14756366.2015.1088844.
- [226] R.D. Porsolt, A. Bertin, M. Jalfre, Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants., *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie.* 229 (1977) 327–36.
- [227] L. Steru, R. Chermat, B. Thierry, P. Simon, The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice., *Psychopharmacology (Berl).* 85 (1985) 367–70.
- [228] C. Aron, P. Simon, C. Larousse, J.R. Boissier, Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers., *Neuropharmacology.* 10 (1971) 459–69.
- [229] S. Ueki, M. Fujiwara, K. Inoue, Y. Kataoka, N. Ibi, [Behavior pharmacology of maprotiline, a new antidepressant]., *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 71 (1975) 789–815.
- [230] N.W. Dunham, T.S. Miya, A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice., *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim).* 46 (1957) 208–9.
- [231] F. De Clerck, A. Van de Water, J. D'Aubioul, H.R. Lu, K. van Rossem, A. Hermans, K. Van Ammel, In vivo measurement of QT prolongation, dispersion and arrhythmogenesis: application to the preclinical cardiovascular safety pharmacology of a new chemical entity., *Fundam. Clin. Pharmacol.* 16 (2002) 125–40.
- [232] A. Acewicz, P. Mierzejewski, A. Jastrzebska, I. Korkosz, K. Karas, H. Sienkiewicz-Jarosz, J. Samochowiec, M. Kolaczkowski, P. Bienkowski, Anxiety- and depressive-like traits in Warsaw alcohol high-preferring (WHP) and Warsaw alcohol low-preferring (WLP) rats., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 122 (2014) 261–5. doi:10.1016/j.pbb.2014.04.010.
- [233] P. Andiné, N. Widermark, R. Axelsson, G. Nyberg, U. Olofsson, E. Mårtensson, M. Sandberg, Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat

- model of psychosis., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290 (1999) 1393–408.
- [234] P. Mierzejewski, M. Kolaczowski, M. Marcinkowska, A. Wesolowska, J. Samochowiec, M. Pawlowski, P. Bienkowski, Antipsychotic-like effects of zolpidem in Wistar rats, *Eur. J. Pharmacol.* 773 (2016) 51–58. doi:10.1016/j.ejphar.2016.01.009.
- [235] A. Acewicz, P. Mierzejewski, A. Jastrzebska, M. Kolaczowski, A. Wesolowska, I. Korkosz, J. Samochowiec, P. Bienkowski, Acoustic Startle Responses and Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Responses in Warsaw Alcohol High-Preferring (WHP) and Warsaw Alcohol Low-Preferring (WLP) Rats, *Alcohol Alcohol.* 47 (2012) 386–389. doi:10.1093/alcalc/ags039.
- [236] C.L. Broekkamp, H.W. Rijk, D. Joly-Gelouin, K.L. Lloyd, Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice., *Eur. J. Pharmacol.* 126 (1986) 223–9.
- [237] H.E. Lee, S.J. Jeon, B. Ryu, S.J. Park, S.Y. Ko, Y. Lee, E. Kim, S. Lee, H. Kim, D.S. Jang, J.H. Ryu, Swertisin, a C-glucosylflavone, ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice with its adenosine A1 receptor antagonistic property., *Behav. Brain Res.* 306 (2016) 137–45. doi:10.1016/j.bbr.2016.03.030.
- [238] K. Pytka, G. Kazek, A. Siwek, B. Mordyl, M. Głuch-Lutwin, A. Rapacz, A. Olczyk, A. Gałuszka, A. Waszkielewicz, H. Marona, J. Sapa, B. Filipek, M. Zygmunt, HBK-7 — A new xanthone derivative and a 5-HT1A receptor antagonist with antidepressant-like properties, *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2016) doi: 10.1016/j.pbb.2016.04.005.
- [239] R.A. Bevins, J. Besheer, Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”., *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1306–11. doi:10.1038/nprot.2006.205.
- [240] H.A. Whiteford, A.J. Ferrari, L. Degenhardt, V. Feigin, T. Vos, The Global Burden of Mental, Neurological and Substance Use Disorders: An Analysis from the Global Burden of Disease Study 2010, *PLoS One.* 10 (2015) e0116820. doi:10.1371/journal.pone.0116820.
- [241] E. Jaaskelainen, P. Juola, N. Hirvonen, J.J. McGrath, S. Saha, M. Isohanni, J. Veijola, J. Miettunen, A Systematic Review and Meta-Analysis of Recovery in Schizophrenia, *Schizophr. Bull.* 39 (2013) 1296–1306. doi:10.1093/schbul/sbs130.

- [242] J.L. Kennedy, C.A. Altar, D.L. Taylor, I. Degtiar, J.C. Hornberger, The social and economic burden of treatment-resistant schizophrenia, *Int. Clin. Psychopharmacol.* 29 (2014) 63–76. doi:10.1097/YIC.0b013e32836508e6.
- [243] J.K. McGavin, K.L. Goa, Aripiprazole, *CNS Drugs.* 16 (2002) 779–786. doi:10.2165/00023210-200216110-00008.
- [244] P. Zajdel, A. Partyka, K. Marciniec, A.J. Bojarski, M. Pawlowski, A. Wesolowska, Quinoline- and isoquinoline-sulfonamide analogs of aripiprazole: novel antipsychotic agents?, *Future Med. Chem.* 6 (2014) 57–75. doi:10.4155/fmc.13.158.
- [245] E. Agai-Csongor, G. Domány, K. Nógrádi, J. Galambos, I. Vágó, G.M. Keserű, I. Greiner, I. Laszlovszky, A. Gere, E. Schmidt, B. Kiss, M. Vastag, K. Tihanyi, K. Sággy, J. Laszy, I. Gyertyán, M. Zájer-Balázs, L. Gémesi, M. Kapás, Z. Szombathelyi, Discovery of cariprazine (RGH-188): a novel antipsychotic acting on dopamine D3/D2 receptors., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 3437–40. doi:10.1016/j.bmcl.2012.03.104.
- [246] D.S. Johnson, C. Choi, L.K. Fay, D.A. Favor, J.T. Repine, A.D. White, H.C. Akunne, L. Fitzgerald, K. Nicholls, B.J. Snyder, S.Z. Whetzel, L. Zhang, K.A. Serpa, Discovery of PF-00217830: aryl piperazine naphthyridinones as D2 partial agonists for schizophrenia and bipolar disorder., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 2621–5. doi:10.1016/j.bmcl.2011.01.059.
- [247] J. Sapa, B. Filipek, K. Kulig, B. Malawska, Antidepressant-like activity of the phenylpiperazine pyrrolidin-2-one derivatives in mice., *Pharmacol. Rep.* 63 (2011) 71–8.
- [248] K. Pytka, A. Rapacz, M. Zygmunt, A. Olczyk, A. Waszkielewicz, J. Sapa, B. Filipek, Antidepressant-like activity of a new piperazine derivative of xanthone in the forced swim test in mice: The involvement of serotonergic system., *Pharmacol. Rep.* 67 160–5. doi:10.1016/j.pharep.2014.08.016.
- [249] K. Pytka, M. Walczak, A. Kij, A. Rapacz, A. Siwek, G. Kazek, A. Olczyk, A. Gałuszka, A. Waszkielewicz, H. Marona, J. Sapa, B. Filipek, The antidepressant-like activity of 6-methoxy-2-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-9H-xanthen-9-one involves serotonergic 5-HT1A and 5-HT2A/C receptors activation., *Eur. J. Pharmacol.* 764 537–46. doi:10.1016/j.ejphar.2015.07.041.
- [250] A.M. Waszkielewicz, K. Pytka, A. Rapacz, E. Welna, M. Jarzyna, G. Satała, A. Bojarski, J. Sapa, P. Żmudzki, B. Filipek, H. Marona, Synthesis and Evaluation

- of Antidepressant-like Activity of Some 4-Substituted 1-(2-methoxyphenyl)Piperazine Derivatives., *Chem. Biol. Drug Des.* 85 (2015) 326–35. doi:10.1111/cbdd.12394.
- [251] M. Kubacka, S. Mogilski, M. Bednarski, L. Nowiński, M. Dudek, E. Zmudzka, A. Siwek, A.M. Waszkielewicz, H. Marona, G. Satała, A. Bojarski, B. Filipek, K. Pytka, Antidepressant-like activity of aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine and evidence for the involvement of serotonin receptor subtypes in their mechanism of action, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 141 (2016). doi:10.1016/j.pbb.2015.11.013.
- [252] J.Y. Kim, D. Kim, S.Y. Kang, W.-K. Park, H.J. Kim, M.E. Jung, E.-J. Son, A.N. Pae, J. Kim, J. Lee, Arylpiperazine-containing pyrimidine 4-carboxamide derivatives targeting serotonin 5-HT(2A), 5-HT(2C), and the serotonin transporter as a potential antidepressant., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 6439–42. doi:10.1016/j.bmcl.2010.09.081.
- [253] S.Y. Kang, E.-J. Park, W.-K. Park, H.J. Kim, D. Jeong, M.E. Jung, K.-S. Song, S.H. Lee, H.J. Seo, M.J. Kim, M. Lee, H.-K. Han, E.-J. Son, A.N. Pae, J. Kim, J. Lee, Arylpiperazine-containing pyrrole 3-carboxamide derivatives targeting serotonin 5-HT2A, 5-HT2C, and the serotonin transporter as a potential antidepressant, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 1705–1711. doi:10.1016/j.bmcl.2010.01.093.
- [254] G. Griebel, R.J. Rodgers, G. Perrault, D.J. Sanger, The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT(1A) receptor antagonists in three rat models of anxiety., *Neuropharmacology.* 39 (2000) 1848–57.
- [255] C. Prakash, V. Soliman, Metabolism and excretion of a novel antianxiety drug candidate, CP-93,393, in Long Evans rats. Differentiation of regioisomeric glucuronides by LC/MS/MS., *Drug Metab. Dispos.* 25 (1997) 1288–97.
- [256] K. Kulig, J. Sapa, D. Maciag, B. Filipek, B. Malawska, Synthesis and pharmacological evaluation of new 1-[3-(4-arylpiperazin-1-yl)-2-hydroxypropyl]-pyrrolidin-2-one derivatives with anti-arrhythmic, hypotensive, and alpha-adrenolytic activity., *Arch. Pharm. (Weinheim).* 340 (2007) 466–75. doi:10.1002/ardp.200700039.
- [257] H. Marona, N. Szkaradek, M. Kubacka, M. Bednarski, B. Filipek, M. Cegla, E. Szneler, Synthesis and Evaluation of Some Xanthone Derivatives for Anti-Arrhythmic, Hypotensive Properties and Their Affinity for Adrenergic

- Receptors, Arch. Pharm. (Weinheim). 341 (2008) 90–98. doi:10.1002/ardp.200700156.
- [258] A. Rapacz, J. Sapa, K. Pytka, M. Dudek, B. Filipek, N. Szkaradek, H. Marona, Antiarrhythmic activity of new 2-methoxyphenylpiperazine xanthone derivatives after ischemia/reperfusion in rats., Pharmacol. Rep. 67 (2015) 1163–7. doi:10.1016/j.pharep.2015.03.011.
- [259] N. Szkaradek, A. Rapacz, K. Pytka, B. Filipek, A. Siwek, M. Cegła, H. Marona, Synthesis and preliminary evaluation of pharmacological properties of some piperazine derivatives of xanthone, Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 514–522. doi:10.1016/j.bmc.2012.11.014.
- [260] J. Handzlik, E. Szymańska, K. Nędza, M. Kubacka, A. Siwek, S. Mogilski, J. Handzlik, B. Filipek, K. Kieć-Kononowicz, Pharmacophore models based studies on the affinity and selectivity toward 5-HT_{1A} with reference to α ₁-adrenergic receptors among arylpiperazine derivatives of phenytoin., Bioorg. Med. Chem. 19 (2011) 1349–60. doi:10.1016/j.bmc.2010.11.051.
- [261] H.J. Seo, E.-J. Park, M.J. Kim, S.Y. Kang, S.H. Lee, H.J. Kim, K.N. Lee, M.E. Jung, M. Lee, M.-S. Kim, E.-J. Son, W.-K. Park, J. Kim, J. Lee, Design and synthesis of novel arylpiperazine derivatives containing the imidazole core targeting 5-HT_{2A} receptor and 5-HT transporter., J. Med. Chem. 54 (2011) 6305–18. doi:10.1021/jm200682b.
- [262] E. Morelli, S. Gemma, R. Budriesi, G. Campiani, E. Novellino, C. Fattorusso, B. Catalanotti, S.S. Coccone, S. Ros, G. Borrelli, M. Persico, I. Fiorini, V. Nacci, P. Ioan, A. Chiarini, M. Hamon, A. Cagnotto, T. Mennini, C. Fracasso, M. Colovic, S. Caccia, S. Butini, Specific targeting of peripheral serotonin 5-HT₃ receptors. Synthesis, biological investigation, and structure-activity relationships., J. Med. Chem. 52 (2009) 3548–62. doi:10.1021/jm900018b.
- [263] M. Lee, J.B. Rangisetty, M.R. Pullagurla, M. Dukat, V. Setola, B.L. Roth, R.A. Glennon, 1-(1-Naphthyl)piperazine as a novel template for 5-HT₆ serotonin receptor ligands., Bioorg. Med. Chem. Lett. 15 (2005) 1707–11. doi:10.1016/j.bmcl.2005.01.031.
- [264] J. Yoon, E.A. Yoo, J.-Y. Kim, A.N. Pae, H. Rhim, W.-K. Park, J.Y. Kong, H.-Y. Park Choo, Preparation of piperazine derivatives as 5-HT₇ receptor antagonists., Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 5405–12. doi:10.1016/j.bmc.2008.04.023.
- [265] F. Kügler, W. Sihver, J. Ermert, H. Hübner, P. Gmeiner, O. Prante, H.H. Coenen,

- Evaluation of 18F-labeled benzodioxine piperazine-based dopamine D4 receptor ligands: lipophilicity as a determinate of nonspecific binding., *J. Med. Chem.* 54 (2011) 8343–52. doi:10.1021/jm200762g.
- [266] Z. Tu, S. Li, J. Cui, J. Xu, M. Taylor, D. Ho, R.R. Luedtke, R.H. Mach, Synthesis and pharmacological evaluation of fluorine-containing D₃ dopamine receptor ligands., *J. Med. Chem.* 54 (2011) 1555–64. doi:10.1021/jm101323b.
- [267] J. Handzlik, E. Szymańska, R. Wójcik, A. Dela, M. Jastrzębska-Więsek, J. Karolak-Wojciechowska, A. Fruziński, A. Siwek, B. Filipek, K. Kieć-Kononowicz, Synthesis and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with α_1 -adrenoceptor antagonistic properties., *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 4245–57. doi:10.1016/j.bmc.2012.05.064.
- [268] M.G. Perrone, L. Bleve, E. Santandrea, P. Vitale, M. Niso, A. Scilimati, The tertiary amine nitrogen atom of piperazine sulfonamides as a novel determinant of potent and selective beta3-adrenoceptor agonists., *ChemMedChem.* 4 (2009) 2080–97. doi:10.1002/cmcd.200900292.
- [269] L. Betti, M. Zanelli, G. Giannaccini, F. Manetti, S. Schenone, G. Strappaghetti, Synthesis of new piperazine-pyridazinone derivatives and their binding affinity toward alpha1-, alpha2-adrenergic and 5-HT1A serotonergic receptors., *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 2828–36. doi:10.1016/j.bmc.2005.12.009.
- [270] J.-M. Beaulieu, S. Espinoza, R.R. Gainetdinov, Dopamine receptors - IUPHAR Review 13., *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 1–23. doi:10.1111/bph.12906.
- [271] K. Pytka, K. Podkowa, A. Rapacz, A. Podkowa, E. Zmudzka, A. Olczyk, J. Sapa, B. Filipek, The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect, *Pharmacol. Reports.* 68 (2016). doi:10.1016/j.pharep.2015.08.007.
- [272] F. Fiorino, B. Severino, E. Magli, E. Perissutti, F. Frecentese, A. Esposito, G.M. Incisivo, A. Ciano, P. Massarelli, C. Nencini, V. Santagada, G. Caliendo, New potent 5-HT(2A) receptor ligands containing an N⁷-cyanopicolinamidine nucleus: Synthesis and in vitro pharmacological evaluation., *Eur. J. Med. Chem.* 47 (2012) 520–9. doi:10.1016/j.ejmech.2011.11.023.
- [273] W. Lewgowd, A.J. Bojarski, M. Szczesio, A. Olczak, M.L. Glowka, S. Mordalski, A. Stanczak, Synthesis and structural investigation of some pyrimido[5,4-c]quinolin-4(3H)-one derivatives with a long-chain arylpiperazine moiety as potent 5-HT1A/2A and 5-HT7 receptor ligands, *Eur. J. Med. Chem.* 46

- (2011) 3348–3361. doi:10.1016/j.ejmech.2011.04.060.
- [274] M.L. López-Rodríguez, M.L. Rosado, B. Benhamú, M.J. Morcillo, E. Fernández, K.-J. Schaper, Synthesis and Structure–Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines. Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationships of Hydantoin–Phenylpiperazine Derivatives with Affinity for 5-HT_{1A} and α_1 Receptors. A Comparison of CoMFA Models, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 1648–1656. doi:10.1021/jm960744g.
- [275] E. Żmudzka, K. Sałaciak, J. Sapa, K. Pytka, Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies, *Life Sci.* 210 (2018) 106–124. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.050.
- [276] Y. Ohno, New insight into the therapeutic role of 5-HT_{1A} receptors in central nervous system disorders., *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 10 (2010) 148–57.
- [277] J. Savitz, I. Lucki, W.C. Drevets, 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder, *Prog. Neurobiol.* 88 (2009) 17–31. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.01.009.
- [278] K. Pytka, M. Głuch-Lutwin, E. Żmudzka, K. Sałaciak, A. Siwek, K. Niemczyk, M. Walczak, M. Smolik, A. Olczyk, A. Gałuszka, J. Śmieja, B. Filipek, J. Sapa, M. Kołaczkowski, K. Pańczyk, A. Waszkielewicz, H. Marona, HBK-17, a 5-HT_{1A} Receptor Ligand With Anxiolytic-Like Activity, Preferentially Activates β -Arrestin Signaling, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1146. doi:10.3389/fphar.2018.01146.
- [279] K. Pytka, M. Głuch-Lutwin, M. Kotańska, A. Waszkielewicz, A. Kij, M. Walczak, Single Administration of HBK-15-a Triple 5-HT_{1A}, 5-HT₇, and 5-HT₃ Receptor Antagonist-Reverses Depressive-Like Behaviors in Mouse Model of Depression Induced by Corticosterone., *Mol. Neurobiol.* (2017). doi:10.1007/s12035-017-0605-4.
- [280] K. Pytka, E. Żmudzka, K. Lustyk, A. Rapacz, A. Olczyk, A. Gałuszka, A. Waszkielewicz, H. Marona, J. Sapa, F. Barbara, The antidepressant- and anxiolytic-like activities of new xanthone derivative with piperazine moiety in behavioral tests in mice, *Indian J. Pharmacol.* 48 (2016). doi:10.4103/0253-7613.182872.
- [281] K. Pytka, K. Gawlik, D. Pawlica-Gosiewska, J. Witalis, A. Waszkielewicz, HBK-14 and HBK-15 with antidepressant-like and/or memory-enhancing

- properties increase serotonin levels in the hippocampus after chronic treatment in mice, *Metab. Brain Dis.* 32 (2017) 547–556. doi:10.1007/s11011-016-9932-9.
- [282] Y. Glikmann-Johnston, M.M. Saling, D.C. Reutens, J.C. Stout, Hippocampal 5-HT1A Receptor and Spatial Learning and Memory, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 289. doi:10.3389/fphar.2015.00289.
- [283] O. Stiedl, E. Pappa, Å. Konradsson-Geuken, S.O. Ågren, The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 162. doi:10.3389/fphar.2015.00162.
- [284] C. Becamel, C. Berthoux, A. Barre, P. Marin, Growing Evidence for Heterogeneous Synaptic Localization of 5-HT2A Receptors, *ACS Chem. Neurosci.* 8 (2017) 897–899. doi:10.1021/acschemneuro.6b00409.
- [285] K. Pytko, A. Partyka, M. Jastrzębska-Więsek, A. Siwek, M. Głuch-Lutwin, B. Mordyl, G. Kazek, A. Rapacz, A. Olczyk, A. Gałuszka, M. Błachuta, A. Waszkielewicz, H. Marona, J. Sapa, B. Filipek, A. Wesołowska, Antidepressant- and Anxiolytic-Like Effects of New Dual 5-HT1A and 5-HT7 Antagonists in Animal Models., *PLoS One.* 10 (2015) e0142499. doi:10.1371/journal.pone.0142499.
- [286] A. Wesołowska, A. Nikiforuk, K. Stachowicz, E. Tatarczyńska, Effect of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression, *Neuropharmacology.* 51 (2006) 578–586. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.04.017.
- [287] K.A. Waters, T.O. Stean, B. Hammond, D.J. Virley, N. Upton, J.N.C. Kew, I. Hussain, Effects of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB-269970 in animal models of psychosis and cognition, *Behav. Brain Res.* 228 (2012) 211–218. doi:10.1016/j.bbr.2011.12.009.
- [288] R. Galici, J.D. Boggs, K.L. Miller, P. Bonaventure, J.R. Atack, Effects of SB-269970, a 5-HT7 receptor antagonist, in mouse models predictive of antipsychotic-like activity, *Behav. Pharmacol.* 19 (2008) 153–159. doi:10.1097/FBP.0b013e3282f62d8c.
- [289] A. Meneses, Memory formation and memory alterations: 5-HT6 and 5-HT7 receptors, novel alternative, *Rev. Neurosci.* 25 (2014) 325–56. doi:10.1515/revneuro-2014-0001.
- [290] A. Rapacz, J. Sapa, L. Nowiński, S. Mogilski, K. Pytko, B. Filipek, A. Siwek, N.

- Szkaradek, H. Marona, Biofunctional studies of new 2-methoxyphenylpiperazine xanthone derivatives with α_1 -adrenolytic properties., *Pharmacol. Rep.* 67 (2015) 267–74. doi:10.1016/j.pharep.2014.10.008.
- [291] S. Cotecchia, The α_1 -adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation., *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 30 (2010) 410–9. doi:10.3109/10799893.2010.518152.
- [292] B.C. Jensen, T.D. O'Connell, P.C. Simpson, Alpha-1-adrenergic receptors: targets for agonist drugs to treat heart failure., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51 (2011) 518–28. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.11.014.
- [293] K. Pytka, K. Lustyk, E. Zmudzka, M. Kotanska, A. Siwek, M. Zygmunt, A. Dziedziczak, J. Sniecikowska, A. Olczyk, A. Galuszka, J. Smieja, A.M. Waszkielewicz, H. Marona, B. Filipek, J. Sapa, S. Mogilski, Chemically homogenous compounds with antagonistic properties at all α_1 -adrenoceptor subtypes but not β_1 -adrenoceptor attenuate adrenaline-induced arrhythmia in rats, *Front. Pharmacol.* 7 (2016). doi:10.3389/fphar.2016.00229.
- [294] A. Rapacz, K. Pytka, J. Sapa, M. Kubacka, B. Filipek, N. Szkaradek, H. Marona, Antiarrhythmic, hypotensive and α_1 -adrenolytic properties of new 2-methoxyphenylpiperazine derivatives of xanthone., *Eur. J. Pharmacol.* 735 (2014) 10–6. doi:10.1016/j.ejphar.2014.04.010.
- [295] G. Ellison, The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias., *Brain Res. Brain Res. Rev.* 20 (1995) 250–67.
- [296] Q.S. Yan, M.E. Reith, P.C. Jobe, J.W. Dailey, Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats., *Brain Res.* 765 (1997) 149–58.
- [297] H.E. Criswell, K.B. Johnson, R.A. Mueller, G.R. Breese, Evidence for involvement of brain dopamine and other mechanisms in the behavioral action of the N-methyl-D-aspartic acid antagonist MK-801 in control and 6-hydroxydopamine-lesioned rats., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265 (1993) 1001–10.
- [298] T.H. Svensson, Dysfunctional brain dopamine systems induced by psychotomimetic NMDA-receptor antagonists and the effects of antipsychotic drugs., *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31 (2000) 320–9.
- [299] A. Gururajan, D.A. Taylor, D.T. Malone, Effect of cannabidiol in a MK-801-

- rodent model of aspects of Schizophrenia, *Behav. Brain Res.* 222 (2011) 299–308. doi:10.1016/j.bbr.2011.03.053.
- [300] A. Gururajan, D.A. Taylor, D.T. Malone, Effect of testing conditions on the propsychotic action of MK-801 on prepulse inhibition, social behaviour and locomotor activity, *Physiol. Behav.* 99 (2010) 131–138. doi:10.1016/j.physbeh.2009.11.005.
- [301] W. Koek, J.H. Woods, G.D. Winger, MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245 (1988) 969–74.
- [302] R.K. Siegel, Phencyclidine and ketamine intoxication: a study of four populations of recreational users., *NIDA Res. Monogr.* (1978) 119–47.
- [303] M.J. Millan, M. Brocco, A. Gobert, F. Joly, K. Bervoets, J. Rivet, A. Newman-Tancredi, V. Audinot, S. Maurel, Contrasting mechanisms of action and sensitivity to antipsychotics of phencyclidine versus amphetamine: importance of nucleus accumbens 5-HT_{2A} sites for PCP-induced locomotion in the rat., *Eur. J. Neurosci.* 11 (1999) 4419–32.
- [304] A. Ouagazzal, A. Nieoullon, M. Amalric, Effects of dopamine D1 and D2 receptor blockade on MK-801-induced hyperlocomotion in rats., *Psychopharmacology (Berl)*. 111 (1993) 427–34.
- [305] V. Bubenikova, M. Votava, J. Horacek, T. Palenicek, C. Dockery, The effect of zotepine, risperidone, clozapine and olanzapine on MK-801-disrupted sensorimotor gating, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80 (2005) 591–596. doi:10.1016/j.pbb.2005.01.012.
- [306] M. Kołaczkowski, P. Mierzejewski, P. Bienkowski, A. Wesołowska, A. Newman-Tancredi, Antipsychotic, antidepressant, and cognitive-impairment properties of antipsychotics: rat profile and implications for behavioral and psychological symptoms of dementia., *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 387 (2014) 545–57. doi:10.1007/s00210-014-0966-4.
- [307] G. Ellison, Stimulant-induced psychosis, the dopamine theory of schizophrenia, and the habenula., *Brain Res. Brain Res. Rev.* 19 (1994) 223–39.
- [308] C. Jones, D. Watson, K. Fone, Animal models of schizophrenia, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1162–1194. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x.
- [309] P.H. Kelly, P.W. Seviour, S.D. Iversen, Amphetamine and apomorphine

- responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum., *Brain Res.* 94 (1975) 507–22.
- [310] A.J. Pijnenburg, W.M. Honig, J.M. Van Rossum, Inhibition of d-amphetamine-induced locomotor activity by injection of haloperidol into the nucleus accumbens of the rat., *Psychopharmacologia.* 41 (1975) 87–95.
- [311] J.M. Delfs, L. Schreiber, A.E. Kelley, Microinjection of cocaine into the nucleus accumbens elicits locomotor activation in the rat., *J. Neurosci.* 10 (1990) 303–10.
- [312] H.-C. Yan, X. Cao, M. Das, X.-H. Zhu, T.-M. Gao, Behavioral animal models of depression, *Neurosci. Bull.* 26 (2010) 327–337. doi:10.1007/s12264-010-0323-7.
- [313] H.G. Vogel, *Drug discovery and evaluation : pharmacological assays*, Wyd. 2, Springer, Nowy Jork, 2008.
- [314] A. Wesołowska, A. Partyka, M. Jastrzębska-Więsek, A. Kolarz, P. Mierzejewski, P. Bieńkowski, M. Kołaczkowski, Tail suspension test does not detect antidepressant-like properties of atypical antipsychotics, *Behav. Pharmacol.* 22 (2011) 7–13. doi:10.1097/FBP.0b013e3283423d6b.
- [315] J.F. Cryan, C. Mombereau, A. Vassout, The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice., *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (2005) 571–625. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.009.
- [316] O. V. Bogdanova, S. Kanekar, K.E. D’Anci, P.F. Renshaw, Factors influencing behavior in the forced swim test, *Physiol. Behav.* 118 (2013) 227–239. doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.012.
- [317] B. Czéh, E. Fuchs, O. Wiborg, M. Simon, Animal models of major depression and their clinical implications, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 64 (2016) 293–310. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.04.004.
- [318] P. Willner, Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS, *Neuropsychobiology.* 52 (2005) 90–110. doi:10.1159/000087097.
- [319] Y. Sugimoto, S. Yamada, J. Yamada, The 5-HT₂ Receptor Antagonist Reduces Immobility of Mice Treated with the Atypical Antidepressant Mianserin in the Forced Swimming Test, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 1479–1481. doi:10.1248/bpb.25.1479.
- [320] J.G. Villarinho, R. Fachineto, F. de V. Pinheiro, G. da S. Sant’Anna, P. Machado, P.A. Dombrowski, C. da Cunha, D. de A. Cabrini, M.A.P. Martins,

- H.G. Bonacorso, N. Zanatta, M.A. Rubin, J. Ferreira, Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 39 (2012) 31–39. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.04.007.
- [321] J. Sapa, B. Filipek, K. Kulig, B. Malawska, Antidepressant-like activity of the phenylpiperazine pyrrolidin-2-one derivatives in mice., *Pharmacol. Rep.* 63 (2011) 71–8.
- [322] A. Zagórska, S. Jurczyk, M. Pawłowski, M. Dybała, G. Nowak, E. Tatarczyńska, A. Nikiforuk, E. Chojnacka-Wójcik, Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of imidazo[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives., *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4288–96. doi:10.1016/j.ejmech.2009.07.014.
- [323] S. Jurczyk, M. Kołaczkowski, E. Maryniak, P. Zajdel, M. Pawłowski, E. Tatarczyńska, A. Kłodzińska, E. Chojnacka-Wójcik, A.J. Bojarski, S. Charakchieva-Minol, B. Duszyńska, G. Nowak, D. Maciag, New arylpiperazine 5-HT(1A) receptor ligands containing the pyrimido[2,1-f]purine fragment: synthesis, in vitro, and in vivo pharmacological evaluation., *J. Med. Chem.* 47 (2004) 2659–66. doi:10.1021/jm030946u.
- [324] B.J. Cao, R.J. Rodgers, Influence of 5-HT1A receptor antagonism on plus-maze behaviour in mice. II. WAY 100635, SDZ 216-525 and NAN-190., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58 (1997) 593–603.
- [325] J.O. Fedotova, G. Hartmann, L. Lénárd, N.S. Sapronov, Effects of 5-HT1A receptor agonist and antagonist on anxiety in intact and ovariectomized female rats., *Acta Physiol. Hung.* 91 (2004) 175–84. doi:10.1556/APhysiol.91.2004.3-4.1.
- [326] F. Massé, B.A. Nic Dhonnchadha, M. Hascoët, M. Bourin, Anxiolytic-like effect of 5-HT(2) ligands and benzodiazepines co-administration: comparison of two animal models of anxiety (the four-plate test and the elevated plus maze), *Behav. Brain Res.* 177 (2007) 214–26. doi:10.1016/j.bbr.2006.11.031.
- [327] M. Bourin, Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective., *Dialogues Clin. Neurosci.* 17 (2015) 295–303.
- [328] A.P. Carobrez, L.J. Bertoglio, Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on., *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (2005) 1193–205. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.04.017.
- [329] V. Galani, B. Patel, Psychotropic activity of *Argyrea speciosa* roots in

- experimental animals, *AYU (An Int. Q. J. Res. Ayurveda)*. 32 (2011) 380. doi:10.4103/0974-8520.93919.
- [330] M. Martínez-Vázquez, R. Estrada-Reyes, A. Martínez-Laurrabaquio, C. López-Rubalcava, G. Heinze, Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract., *J. Ethnopharmacol.* 141 (2012) 908–17. doi:10.1016/j.jep.2012.03.028.
- [331] L.J. Miller, Prazosin for the Treatment of Posttraumatic Stress Disorder Sleep Disturbances, *Pharmacotherapy*. 28 (2008) 656–666. doi:10.1592/phco.28.5.656.
- [332] L.Y. Wang, J.B. Shofer, K. Rohde, K.L. Hart, D.J. Hoff, Y.H. McFall, M.A. Raskind, E.R. Peskind, Prazosin for the Treatment of Behavioral Symptoms in Patients With Alzheimer Disease With Agitation and Aggression, *Am. J. Geriatr. Psychiatry*. 17 (2009) 744–751. doi:10.1097/JGP.0b013e3181ab8c61.
- [333] S. Carson, M.S. McDonagh, K. Peterson, A Systematic Review of the Efficacy and Safety of Atypical Antipsychotics in Patients with Psychological and Behavioral Symptoms of Dementia, *J. Am. Geriatr. Soc.* 54 (2006) 354–361. doi:10.1111/j.1532-5415.2005.00566.x.
- [334] C. Rummel-Kluge, K. Komossa, S. Schwarz, H. Hunger, F. Schmid, W. Kissling, J.M. Davis, S. Leucht, Second-Generation Antipsychotic Drugs and Extrapiramidal Side Effects: A Systematic Review and Meta-analysis of Head-to-Head Comparisons, *Schizophr. Bull.* 38 (2012) 167–177. doi:10.1093/schbul/sbq042.
- [335] M. Dhanawat, N. Das, S.K. Shrivastava, Design, synthesis, anticonvulsant screening and 5HT_{1A/2A} receptor affinity of N(3)-substituted 2,4-imidazolidinediones and oxazolidinediones., *Drug Discov. Ther.* 5 (2011) 227–37.
- [336] Crumb, Cavero, QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development., *Pharm. Sci. Technol. Today*. 2 (1999) 270–280.
- [337] J. Sapa, M. Kubacka, The possible mechanism of hypotensive activity of some pyrrolidin-2-one derivatives with antagonist properties at alpha1-adrenoceptors, *Eur. J. Pharmacol.* 673 (2011) 40–48. doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.010.
- [338] J. Sapa, Antiarrhythmic activity of novel S-enantiomers of pyrrolidin-2-one derivatives with adrenolytic properties., *Acta Pol. Pharm.* 67 (2010) 537–42.

- [339] J. Sapa, A. Nowaczyk, K. Kulig, Antiarrhythmic and antioxidant activity of novel pyrrolidin-2-one derivatives with adrenergic properties, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 383 (2011) 13–25. doi:10.1007/s00210-010-0566-x.
- [340] M. Kołaczkowski, M. Marcinkowska, A. Bucki, M. Pawłowski, K. Mitka, J. Jaśkowska, P. Kowalski, G. Kazek, A. Siwek, A. Wasik, A. Wesołowska, P. Mierzejewski, P. Bienkowski, Novel Arylsulfonamide Derivatives with 5-HT₆/5-HT₇ Receptor Antagonism Targeting Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 4543–4557. doi:10.1021/jm401895u.
- [341] A. Bucki, M. Marcinkowska, J. Śniecikowska, K. Więckowski, M. Pawłowski, M. Głuch-Lutwin, A. Gryboś, A. Siwek, K. Pytka, M. Jastrzębska-Więsek, A. Partyka, A. Wesołowska, P. Mierzejewski, M. Kołaczkowski, Novel 3-(1,2,3,6-Tetrahydropyridin-4-yl)-1 *H*-indole-Based Multifunctional Ligands with Antipsychotic-Like, Mood-Modulating, and Procognitive Activity, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 7483–7501. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00839.
- [342] J.P. Rung, A. Carlsson, K. Rydén Markinhuhta, M.L. Carlsson, (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 29 (2005) 827–832. doi:10.1016/j.pnpbp.2005.03.004.
- [343] C.D. Kilts, The changing roles and targets for animal models of schizophrenia., *Biol. Psychiatry.* 50 (2001) 845–55.
- [344] M. Koch, The neurobiology of startle., *Prog. Neurobiol.* 59 (1999) 107–28.
- [345] B. Ellenbroek, Pre-attentive processing and schizophrenia: animal studies, *Psychopharmacology (Berl).* 174 (2004) 65–74. doi:10.1007/s00213-003-1684-7.
- [346] N.R. Swerdlow, G.A. Light, Animal Models of Deficient Sensorimotor Gating in Schizophrenia: Are They Still Relevant?, in: *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, 2015: pp. 305–325. doi:10.1007/7854_2015_5012.
- [347] J. Matsuo, M. Ota, S. Hidese, T. Teraishi, H. Hori, I. Ishida, M. Hiraishi, H. Kunugi, Sensorimotor Gating in Depressed and Euthymic Patients with Bipolar Disorder: Analysis on Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Response Stratified by Gender and State, *Front. Psychiatry.* 9 (2018) 123. doi:10.3389/fpsy.2018.00123.
- [348] H. Meteran, E. Vindbjerg, S.W. Uldall, B. Glenthøj, J. Carlsson, B. Oranje,

- Startle habituation, sensory, and sensorimotor gating in trauma-affected refugees with posttraumatic stress disorder., *Psychol. Med.* (2018) 1–9. doi:10.1017/S003329171800123X.
- [349] O. Mutlu, T. Páleníček, N. Pinterová, K. Šíchová, J. Horáček, K. Holubová, C. Höschl, A. Stuchlík, F. Erden, K. Valeš, Effects of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone (AKH/RPCH) family of peptides on MK-801-induced schizophrenia models, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 32 (2018) 589–602. doi:10.1111/fcp.12386.
- [350] E.M. Sánchez-Morla, J. Mateo, A. Aparicio, M.Á. García-Jiménez, E. Jiménez, J.L. Santos, Prepulse inhibition in euthymic bipolar disorder patients in comparison with control subjects, *Acta Psychiatr. Scand.* 134 (2016) 350–359. doi:10.1111/acps.12604.
- [351] K. Schwabe, J.K. Krauss, What rodent models of deep brain stimulation can teach us about the neural circuit regulation of prepulse inhibition in neuropsychiatric disorders, *Schizophr. Res.* 198 (2018) 45–51. doi:10.1016/j.schres.2017.06.033.
- [352] H. Shoji, T. Miyakawa, Relationships between the acoustic startle response and prepulse inhibition in C57BL/6J mice: a large-scale meta-analytic study, *Mol. Brain.* 11 (2018) 42. doi:10.1186/s13041-018-0382-7.
- [353] M.A. Geyer, K. Krebs-Thomson, D.L. Braff, N.R. Swerdlow, Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review., *Psychopharmacology (Berl)*. 156 (2001) 117–54.
- [354] N.R. Swerdlow, M. Weber, Y. Qu, G.A. Light, D.L. Braff, Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research, *Psychopharmacology (Berl)*. 199 (2008) 331–388. doi:10.1007/s00213-008-1072-4.
- [355] N.R. Swerdlow, D. Zisook, N. Taaid, Seroquel (ICI 204,636) restores prepulse inhibition of acoustic startle in apomorphine-treated rats: Similarities to clozapine., *Psychopharmacology (Berl)*. 114 (1994) 675–8.
- [356] G.B. Varty, G.A. Higgins, Examination of drug-induced and isolation-induced disruptions of prepulse inhibition as models to screen antipsychotic drugs., *Psychopharmacology (Berl)*. 122 (1995) 15–26.
- [357] M.A. Geyer, The family of sensorimotor gating disorders: comorbidities or

- diagnostic overlaps?, *Neurotox. Res.* 10 (2006) 211–20.
- [358] C.-H. Chen, P.-W. Lee, H.-M. Liao, P.-K. Chang, Neurologlin 2 R215H Mutant Mice Manifest Anxiety, Increased Prepulse Inhibition, and Impaired Spatial Learning and Memory, *Front. Psychiatry.* 8 (2017) 257. doi:10.3389/fpsy.2017.00257.
- [359] K. Fu, Y. Miyamoto, K. Sumi, E. Saika, S.-I. Muramatsu, K. Uno, A. Nitta, Overexpression of transmembrane protein 168 in the mouse nucleus accumbens induces anxiety and sensorimotor gating deficit., *PLoS One.* 12 (2017) e0189006. doi:10.1371/journal.pone.0189006.
- [360] L. Li, Y. Du, N. Li, X. Wu, Y. Wu, Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33 (2009) 1157–1167. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.02.001.
- [361] D.C. Hoffman, H. Donovan, J. V Cassella, The effects of haloperidol and clozapine on the disruption of sensorimotor gating induced by the noncompetitive glutamate antagonist MK-801., *Psychopharmacology (Berl).* 111 (1993) 339–44.
- [362] T. Bast, W. Zhang, J. Feldon, I.M. White, Effects of MK801 and neuroleptics on prepulse inhibition: re-examination in two strains of rats., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67 (2000) 647–58.
- [363] R.M.J. Deacon, Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts., *Nat. Protoc.* 1 (2006) 122–4. doi:10.1038/nprot.2006.20.
- [364] K. Njung'e, S.L. Handley, Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents., *Br. J. Pharmacol.* 104 (1991) 105–12.
- [365] A. Partyka, A. Wasik, M. Jastrzębska-Więsek, P. Mierzejewski, P. Bieńkowski, M. Kołaczkowski, A. Wesołowska, ADN-1184, a monoaminergic ligand with 5-HT_{6/7} receptor antagonist action, exhibits activity in animal models of anxiety, *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 389 (2016) 593–602. doi:10.1007/s00210-016-1229-3.
- [366] P. Venault, G. Chapouthier, L.P. de Carvalho, J. Simiand, M. Morre, R.H. Dodd, J. Rossier, Benzodiazepine impairs and β -carboline enhances performance in learning and memory tasks, *Nature.* 321 (1986) 864–866. doi:10.1038/321864a0.
- [367] M. Sarter, J. Hagan, P. Dudchenko, Behavioral screening for cognition

- enhancers: from indiscriminate to valid testing: Part I, *Psychopharmacology (Berl)*. 107 (1992) 144–159. doi:10.1007/BF02245132.
- [368] F.J. van der Staay, K. Rutten, C. Erb, A. Blokland, Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats, *Behav. Brain Res.* 220 (2011) 215–229. doi:10.1016/j.bbr.2011.01.052.
- [369] E.C. Hersch, S. Falzgraf, Management of the behavioral and psychological symptoms of dementia., *Clin. Interv. Aging*. 2 (2007) 611–21.
- [370] F.G. Boess, M. Hendrix, F.-J. van der Staay, C. Erb, R. Schreiber, W. van Staveren, J. de Vente, J. Prickaerts, A. Blokland, G. Koenig, Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance, *Neuropharmacology*. 47 (2004) 1081–1092. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.07.040.
- [371] W. Danysz, W. Zajackowski, C.G. Parsons, Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands., *Behav. Pharmacol.* 6 (1995) 455–474.
- [372] C. Hölscher, Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond., *J. Neurosci. Res.* 58 (1999) 62–75.
- [373] B. Milner, L.R. Squire, E.R. Kandel, Cognitive neuroscience and the study of memory., *Neuron*. 20 (1998) 445–68.
- [374] J.G. Csernansky, M. Martin, R. Shah, A. Bertchume, J. Colvin, H. Dong, Cholinesterase Inhibitors Ameliorate Behavioral Deficits Induced by MK-801 in Mice, *Neuropsychopharmacology*. 30 (2005) 2135–2143. doi:10.1038/sj.npp.1300761.
- [375] E. Baldi, C. Bucherelli, The inverted ‘u-shaped’ dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation., *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 3 (2005) 9–21. doi:10.2201/nonlin.003.01.002.
- [376] J.M. Davis, D.J. Svendsgaard, U-shaped dose-response curves: their occurrence and implications for risk assessment., *J. Toxicol. Environ. Health*. 30 (1990) 71–83. doi:10.1080/15287399009531412.
- [377] A. Ennaceur, One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues, *Behav. Brain Res.* 215 (2010) 244–254. doi:10.1016/j.bbr.2009.12.036.
- [378] M. Antunes, G. Biala, The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications, *Cogn. Process.* 13 (2012) 93–110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z.

- [379] M.L. Reger, D.A. Hovda, C.C. Giza, Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task, *Dev. Psychobiol.* 51 (2009) 672–678. doi:10.1002/dev.20402.
- [380] R. HAMMOND, L.E. Tull, R.W. Stackman, On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory, *Neurobiol. Learn. Mem.* 82 (2004) 26–34. doi:10.1016/j.nlm.2004.03.005.
- [381] M.G. Baxter, “I’ve seen it all before”: Explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010)., *Behav. Neurosci.* 124 (2010) 706–709. doi:10.1037/a0021029.
- [382] M. Nilsson, S. Hansson, A. Carlsson, M.L. Carlsson, Differential effects of the N-methyl-d-aspartate receptor antagonist MK-801 on different stages of object recognition memory in mice, *Neuroscience*. 149 (2007) 123–130. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.07.019.
- [383] Mierzejewski Paweł, Unikatowy wpływ arypiprazolu na funkcje poznawcze – miejsce w leczeniu młodzieży i pacjentów w wieku podeszłym, *Psychiatria*. 14 (2017) 78–84.

Spis tabel

Tab. 1.1 Objawy schizofrenii [7,16]	18
Tab. 1.2 Klasyfikacja schizofrenii według ICD-10 [17]	19
Tab. 1.3 Podział i profil działania receptorowego oraz klinicznego najważniejszych neuroleptyków [6,86,88].....	26
Tab. 1.4 Działania niepożądane neuroleptyków [91,92]	28
Tab. 4.1 Warunki oznaczeń radioreceptorowych	52
Tab. 4.2 Parametry analiz funkcjonalnych metodą Aequiscreen w zależności od rodzaju receptora.....	54
Tab. 5.1 Powinowactwo badanych związków do receptorów dopaminergicznych D ₂ , serotoninergicznych 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} , 5-HT ₆ i 5-HT ₇ oraz adrenergicznych α ₁ i α ₂	71
Tab. 5.2 Aktywność wewnętrzna badanych związków względem receptorów dopaminergicznych D ₂	73
Tab. 5.3 Aktywność wewnętrzna badanych związków względem receptorów serotoninergicznych 5-HT _{1A}	74
Tab. 5.4 Aktywność wewnętrzna badanych związków względem receptorów serotoninergicznych 5-HT _{2A}	75
Tab. 5.5 Aktywność wewnętrzna badanych związków względem receptorów serotoninergicznych 5-HT ₇	76
Tab. 5.6 Wpływ związków na odwracanie hiperlokomocji indukowanej podaniem MK-801 u myszy	78
Tab. 5.7 Wpływ związków na odwracanie hiperlokomocji indukowanej podaniem amfetaminy u myszy	80
Tab. 5.8 Wpływ związków na czas bezruchu oraz czas pływania i wspinania w teście wymuszonego pływania u myszy	82
Tab. 5.9 Wpływ związków na czas bezruchu w teście zawieszania za ogon u myszy... ..	84
Tab. 5.10 Wpływ związków na liczbę przejść karanych impulsem elektrycznym w teście czterech płytek u myszy.....	86
Tab. 5.11 Wpływ związków na czas spędzony w ramionach otwartych oraz na liczbę wejść do ramion otwartych labiryntu w teście uniesionego labiryntu krzyżowego u myszy	88
Tab. 5.12 Wpływ związków na ruchliwość spontaniczną myszy.....	91

Tab. 5.13 Wpływ związków na indukowanie katalepsji u myszy	93
Tab. 5.14 Wpływ związków na koordynację ruchową myszy w teście rotarod.....	94
Tab. 5.15 Wpływ związków na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura.....	97
Tab. 5.16 Wpływ związków w dawce 5 mg/kg na prawidłowy elektrokardiogram u szczura	102

Spis rycin

Ryc. 3.1 Wzór strukturalny związku JJGW01.....	42
Ryc. 3.2 Wzór strukturalny związku JJGW02.....	43
Ryc. 3.3 Wzór strukturalny związku JJGW03.....	43
Ryc. 3.4 Wzór strukturalny związku JJGW07.....	44
Ryc. 3.5 Wzór strukturalny związku JJGW08.....	44
Ryc. 3.6 Wzór strukturalny związku JJGW09.....	45
Ryc. 3.7 Wzór strukturalny związku JJGW11.....	45
Ryc. 3.8 Wzór strukturalny związku JJGW12.....	46
Ryc. 5.1 Wpływ związków na presyjne działanie po podaniu metoksaminy.....	100
Ryc. 5.2 Wpływ związków na aktywność lokomotoryczną w teście otwartego pola po podaniu MK-801 u szczurów.....	104
Ryc. 5.3 Wpływ związków na hamowanie reakcji „startle” (1) oraz na zmiany wielkości „startle” (2) w teście bramkowania przedsygnałowego po podaniu MK-801 u szczurów.....	107
Ryc. 5.4 Wpływ związków na liczbę zagrzebanych kulek w teście zagrzebywania u myszy.....	110
Ryc. 5.5 Wpływ związków na czas latencji myszy w teście biernego unikania.....	112
Ryc. 5.6 Wpływ związków na czas latencji myszy w teście biernego unikania po podaniu MK-801.....	114
Ryc. 5.7 Wpływ związków na czas eksploracji nowego obiektu u myszy w teście rozpoznawania nowego obiektu.....	116
Ryc. 5.8 Wpływ związków na czas eksploracji nowego obiektu u myszy w teście rozpoznawania nowego obiektu po podaniu MK-801.....	118
Ryc. 6.1 Wzór ogólny długołańcuchowych pochodnych arylopiiperazyny.....	120
Ryc. 6.2 Struktura salicylamidu.....	121
Ryc. 6.3 Struktura etenzamidu.....	121