

# FUNKCJONALNY PROFIL *IN VIVO* DO POSTSYNAPTYCZNYCH RECEPTORÓW 5-HT<sub>1A</sub>

## NOWYCH ANALOGÓW MM 77 I MP 349 ZE ZMODYFIKOWANYM FRAGMENTEM IMIDOWYM

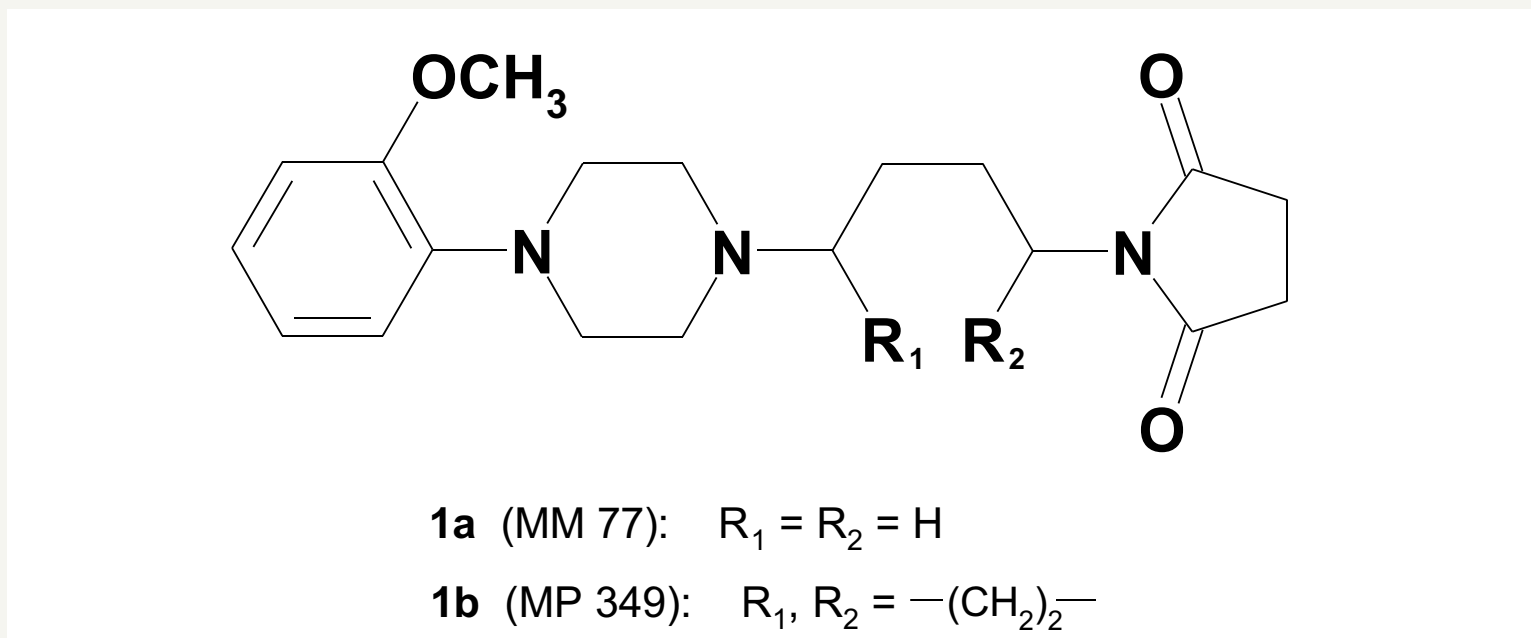


M. H. Paluchowska<sup>a</sup>, S. Czarakcziewa-Minol<sup>a</sup>, A. Bojarski<sup>a</sup>, E. Tatarczyńska<sup>b</sup>, A. Kłodzińska<sup>b</sup>, K. Stachowicz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Zakład Chemii Leków, <sup>b</sup> Zakład Badań Nowych Leków, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

### Wprowadzenie

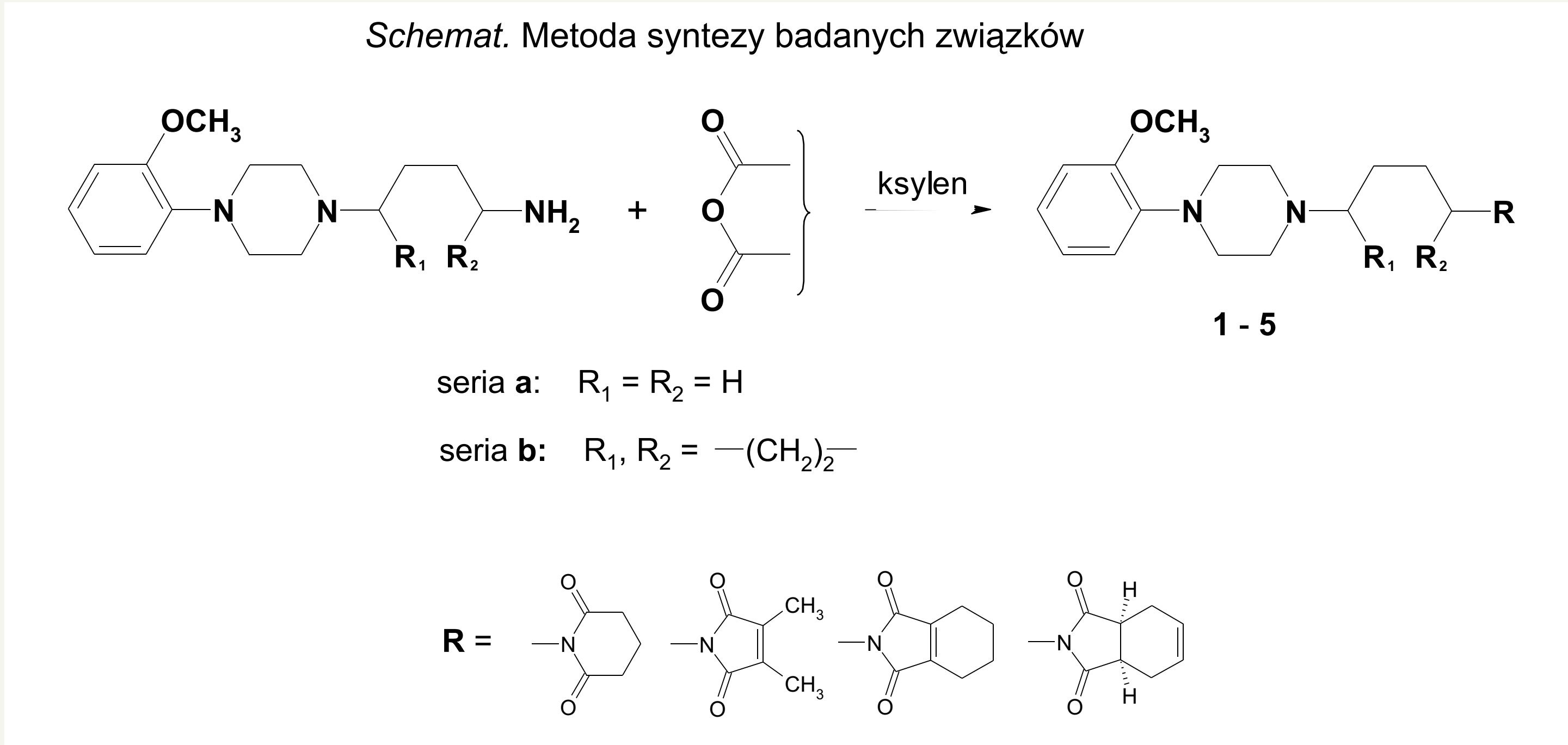
Systematyczne badania nad zależnością struktura-aktywność prowadzone przez nas w grupie arylopiperazynowych ligandów receptorów 5-HT<sub>1A</sub> doprowadziły do otrzymania MM 77 (**1a**), antagonisty postsynaptycznych receptorów 5-HT<sub>1A</sub>,<sup>1</sup> który wykazywał działanie przeciwlękowe.<sup>2</sup> Ostatnio opisaliśmy syntezę i charakterystykę farmakologiczną jego analogu konformacyjnie usztywnionego - związku MP 349 (**1b**), który został uznany jako pełny antagonista receptorów 5-HT<sub>1A</sub> o potencjalnym działaniu przeciwlękowym.<sup>3,4</sup> Związek MP 349 jest pierwszym arylopiperazynowym pełnym antagonistą receptorów 5-HT<sub>1A</sub> o ściśle określonej strukturze przestrzennej.



Prezentowane obecnie badania dotyczą serii nowych analogów MM 77 (seria **a**) oraz MP 349 (seria **b**) ze zmodyfikowanym fragmentem imidowym.

### Synteza badanych związków

Nowe związki obu serii otrzymano przez reakcje 4-[4-(o-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksyloaminy<sup>5</sup> z odpowiednim bezwodnikiem, we wrzącym ksylenie. Standardowo, wszystkie produkty zostały wyizolowane z mieszaniny reakcyjnej techniką chromatografii kolumnowej stosując SiO<sub>2</sub> jako fazę stacjonarną, układy eluentów podano w *Tabeli 1*.



Struktury wszystkich nowych związków zostały potwierdzone ich widmami <sup>1</sup>H NMR. Na podstawie analizy stałych sprzężeń obserwowanych dla wodorów pierścienia cykloheksanowego w widmach sztywnych związków serii **b**, przypisano im konfigurację 1e,4e-dipodstawionych pochodnych cykloheksanu. Zsyntetyzowane, nowe arylopiperazyny przeprowadzono w ich sole - chlorowodorki - i w tej postaci użyto do badań *in vitro* i *in vivo*. Skład otrzymanych soli ustalono na podstawie analizy elementarnej.

Intensywność występowania LLR u szczurów po podaniu testowanych związków oceniano wizualnie, stosując następującą skalę: 0 - dolne siekacze bardzo słabo widoczne lub niewidoczne, 0.5 - dolne siekacze częściowo widoczne, 1 - dolna warga całkowicie opadnięta, dolne siekacze widoczne w całości. Obserwacje rozpoczynano 15 minut po iniekcji badanego związku i powtarzano w odstępach 15-minutowych prze 45 minut. Ponadto u tych samych zwierząt badano wpływ testowanych związków na LLR wywołane podaniem 8-OH-DPAT, oceniając intensywność występowania efektu po 15, 30 i 45 minutach od podania agonisty.

**Tabela 2.** Wywoływanie przez badane związki opadnięcia dolnej wargi (lower lip retraction, LLR) (A) oraz ich wpływ na LLR wywoływane przez 8-OH-DPAT (B) u szczurów

Związek	Dawka (mg/kg)	Średnia		S.E.M.	
		A		B	
Rozpuszczalnik	-	0.1	0.1	2.7	0.1
<b>1a</b> (MM 77) <sup>1</sup>	4	0.1	0.1	1.6	0.1 <sup>b</sup>
	8	0.1	0.1	1.1	0.2 <sup>b</sup>
<b>1b</b> (MP 349) <sup>3</sup>	0.25	0.0	0.0	1.2	0.2 <sup>b</sup>
	0.5	0.1	0.1	0.7	0.1 <sup>a</sup>
Rozpuszczalnik	-	0.1	0.1	2.8	0.1
<b>2a</b>	5	0.2	0.1	1.5	0.3 <sup>a</sup>
	10	0.4	0.2	0.3	0.1 <sup>a</sup>
<b>2b</b>	2.5	0.0	0.1	1.3	0.2 <sup>a</sup>
	5	0.7	0.2	0.3	0.2 <sup>a</sup>
Rozpuszczalnik	-	0.1	0.1	2.7	0.1
<b>3a</b>	1.25	0.0	0.0	2.4	0.7
	2.5	0.1	0.1	1.2	0.2 <sup>a</sup>
	5	0.1	0.1	1.0	0.3 <sup>a</sup>
	10	0.1	0.1	0.3	0.1 <sup>a</sup>
<b>3b</b>	2.5	0.25	0.1	1.8	0.4 <sup>b</sup>
	5	0.0	0.0	0.7	0.3 <sup>a</sup>
Rozpuszczalnik	-	0.1	0.1	2.8	0.1
<b>4a</b>	1.25	0.0	0.0	2.2	0.4
	2.5	0.0	0.0	0.8	0.2 <sup>a</sup>
	5	0.0	0.0	0.6	0.3 <sup>a</sup>
<b>4b</b>	2.5	0.5	0.2	2.1	0.2 <sup>a</sup>
	5	1.0	0.2 <sup>a</sup>	1.1	0.5 <sup>a</sup>
	10	1.2	0.2 <sup>a</sup>	1.0	0.2 <sup>a</sup>
Rozpuszczalnik	-	0.1	0.1	2.7	0.1
<b>5a</b>	10	0.3	0.2	1.6	0.3 <sup>a</sup>
	20	1.5	0.3 <sup>a</sup>	1.3	0.3 <sup>a</sup>
<b>5b</b>	5	0.0	0.0	1.4	0.3 <sup>a</sup>
	10	0.1	0.1	0.9	0.2 <sup>a</sup>

Badane związki (ip) podawano 15 min przed testem (A) lub 45 min przed 8-OH-DPAT (1mg/kg, sc) (B); n=6 szczurów/grupe; <sup>a</sup> p<0.01, <sup>b</sup> p<0.05 vs rozpuszczalnik (A) lub vs rozpuszczalnik + 8-OH-DPAT (B).

**Tabela 3.** Funkcjonalny profil badanych związków do postsynaptycznych receptorów 5-HT<sub>1A</sub>

Związek	Rodzaj aktywności
<b>1a</b> (MM 77)	antagonista
<b>1b</b> (MP 349)	antagonista
<b>2a</b>	antagonista
<b>2b</b>	antagonista
<b>3a</b>	antagonista
<b>3b</b>	antagonista
<b>4a</b>	antagonista
<b>4b</b>	częściowy agonista
<b>5a</b>	częściowy agonista
<b>5b</b>	antagonista

### Dyskusja wyników

Powiększenie pierścienia imidowego w strukturze MM 77 o jedną grupę metylenową nie zmienia powinowactwa do receptorów 5-HT<sub>1A</sub> (**1a** vs **2a**). Usztywnienie struktury związku **2a** daje związek **2b**, który w dalszym ciągu charakteryzuje się bardzo wysokim nanomolowym powinowactwem. W badaniach *in vivo* związki **2a** i **2b** zachowują się jak antagoniści postsynaptycznych receptorów 5-HT<sub>1A</sub>.

Wprowadzenie do pięcioczołowego pierścienia imidowego w ligandzie MM 77 podwójnego wiązania nie zmienia powinowactwa w przypadku związku **4a**. Nieco obniżone, choć ciągle wysokie powinowactwo obserwuje się dla związków **3a**, **3b** i **4b** ( $K_i$  = 19-27 nM). Ligandy **3a** i **3b** (z pięcioczołowym pierścieniem maleimidowym podstawionym dwoma grupami metylowymi) zachowują się jak macierzyste związki MM 77 i MP 349 wykazując antagonizm wobec postsynaptycznych receptorów 5-HT<sub>1A</sub>. Związek **4a** ze skondensowanym z układem maleimidowym pierścieniem sześcioczołowym również wykazuje antagonizm, natomiast jego usztywniony analog **4b** jest częściowym agonistą

Modyfikacja labilnej struktury MM 77 poprzez dodanie do fragmentu imidowego *cis*-skondensowanego sześcioczołowego pierścienia cykloheksenu zmienia profil funkcyjnalny i związek **5a** zachowuje się jak częściowy agonista postsynaptycznych receptorów 5-HT<sub>1A</sub>. Jego konformacyjnie zdefiniowany analog **5b** pozostaje nadal, tak jak MM 77, antagonistą tych receptorów.

### Wnioski końcowe

- W „giętkiej” serii **a** przeprowadzona modyfikacja fragmentu imidowego w strukturze MM 77 tylko w przypadku związku **5a** (częściowy agonista) zmienia profil funkcyjnalny wobec postsynaptycznych receptorów 5-HT<sub>1A</sub>. Obecność podwójnego wiązania w sześcioczołowym pierścieniu może mieć związek z takim zachowaniem liganda. Wymaga to dalszych porównawczych badań konformacyjnych.
- Wprowadzone zmiany strukturalne we fragmencie imidowym MP 349, antagonisty receptorów 5-HT<sub>1A</sub>, również tylko w jednym przypadku tj. liganda **4b** niespodziewanie zmieniają profil funkcyjnalny i związek ten można scharakteryzować jako częściowego agonistę postsynaptycznych receptorów 5-HT<sub>1A</sub>. Dalsze badania farmakologiczne powinny wyjaśnić to zagadnienie.

#### Piśmiennictwo

<sup>1</sup> M. J. Mokrosz et al., *Med. Chem. Res.*, **1994**, 4, 161; <sup>2</sup> G. Griebel et al., *Neuropharmacology*, **2000**, 39, 1848; <sup>3</sup> M. H. Paluchowska et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, 37, 273; <sup>4</sup> A. Wesolowska et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2003**, 55, 533; <sup>5</sup> M. H. Paluchowska et al., *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4952; <sup>6</sup> Synteza N-fenylmaleimidu w *Organic Synthesis, Coll. Vol. V*, J. Wiley & Sons Inc. **1973**, Str. 944; <sup>7</sup> Y.C. Cheng, W.H. Prusoff, *Biochem.Pharmacol.*, **1973**, 22, 3099; <sup>8</sup> H. H. G. Berendsen et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **1989**, 33, 821.

Prezentowane badania są częściowo finansowane przez Komitet Badań Naukowych (KBN), Grant No. 3-P05F-012-23.

### Badania in vitro

Dla wszystkich zsyntetyzowanych związków określono powinowactwo do serotoninowych receptorów 5-HT<sub>1A</sub> (w mózgu szczurów) na podstawie ich zdolności do wypierania [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT tj. trytowanej 8-hydroksy-2-(di-*n*-propyloamino)tetraliny. Stałą wiązania  $K_i$  określono na podstawie równania Chenga i Prusoffa<sup>7</sup>. Wyniki przedstawiono w *Tabeli 1*. Dla porównania dołączono również prezentowane w poprzednich pracach dane dla **1a** (MM 77) i **2a** (MP 349).

### Badania in vivo

Obie serie nowych ligandów receptorów 5-HT<sub>1A</sub> zostały poddane badaniom farmakologicznym w celu określenia ich aktywności wobec tych receptorów zlokalizowanych postsynaptycznie. Z aktywacją postsynaptycznych receptorów 5-HT<sub>1A</sub> związany jest efekt opadnięcia dolnej wargi (LLR) u szczurów, który wywołują agoniści tych receptorów np. 8-OH-DPAT, natomiast blokowanie LLR wywołane przez agonistę określa się jako antagonizm. Eksperyment wykonano metodą opisana przez Berendsena et al<sup>8</sup>. Zwierzęta umieszczono pojedynczo w klatkach drucianych o wymiarach 30x25x25 cm i adaptowano przez okres 30 minut.