

Budowa ośrodkowego układu cholinergicznego

The structure of the central cholinergic system

HALINA SIENKIEWICZ-JAROSZ¹, AGNIESZKA CZŁONKOWSKA¹,
MAREK SIEMIĄTKOWSKI², ADAM PŁAŻNIK^{1,2}

Z: 1. Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej AM w Warszawie
2. Zakładu Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego IPiN w Warszawie

STRESZCZENIE. Autorzy przedstawiają aktualne informacje dotyczące budowy ośrodkowego układu cholinergicznego, fizjologicznych podstaw jego funkcjonowania, rolę receptorów muskarynowych i nikotynowych w o.u.n. (o.u.n.) oraz związki działające na te receptory.

SUMMARY. The authors present the most recent information on the structure of the central cholinergic system, the physiological basis of its functioning, the role of muscarine and nicotine receptors in the CNS and the substances which affect these receptors.

Słowa kluczowe: ośrodkowy układ cholinergiczny / budowa / fizjologia
Key words: central cholinergic system / structure / physiology

STRUKTURY CHOLINERGICZNE W O.U.N.

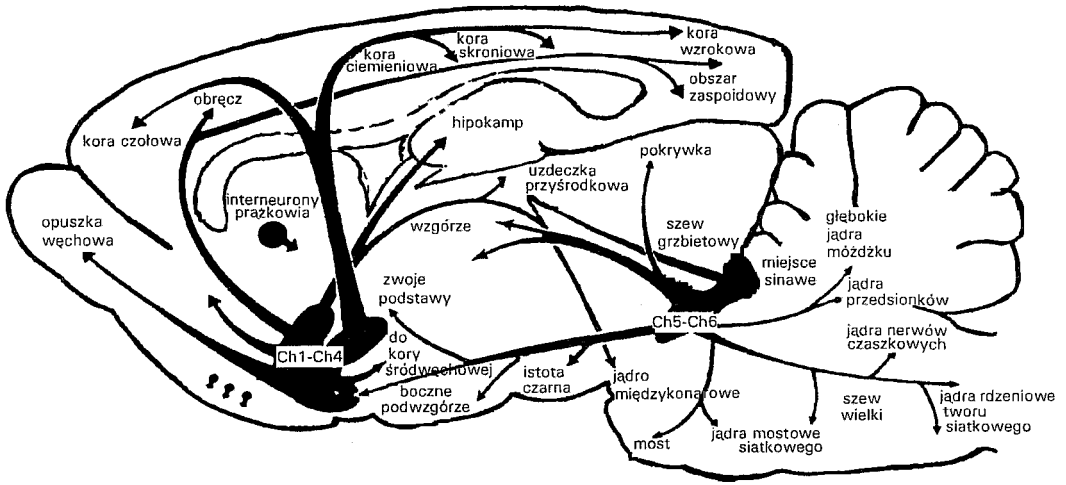
W ciągu ostatnich kilku lat wiedza na temat roli ośrodkowego układu cholinergicznego w zdrowiu, chorobach psychicznych i neurologicznych gwałtownie rozwinęła się. Zsyntetyzowano także wiele substancji i leków cholinergicznym wykazujących bardzo ciekawe i potencjalnie korzystne terapeutycznie profile psycho- i neurotropowe. Celem tego opracowania, przedstawionego w dwóch częściach, jest omówienie najistotniejszych faktów dotyczących budowy i czynności ośrodkowych neuronów i szlaków cholinergicznym, a także możliwych oddziaływań terapeutycznych.

Neurony cholinergiczne występują w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym w dużej koncentracji. Poprzez wpływ na czynność komórek efektorowych w narządach, pracę mięśni, zwojów układu wegetatywnego czy procesy zachodzące w mózgu bezpo-

średnio lub przez modyfikację uwalniania innych neuroprzekaźników, kontrolują szereg ważnych funkcji życiowych. Grupy neuronów uwalnających acetylocholiny unerwiają wiele różnych struktur ośrodkowego układu nerwowego. Nie tworzą typowych jąder. Często obok neuronów cholinergicznym występują w nich komórki nerwowe uwalnające inne neuroprzekaźniki.

Szlaki cholinergiczne w o.u.n. należą do dróg filogenetycznie starych. Najogólniej można je podzielić na kolumnę przednią i tylną. Do pierwszej należą neurony zgrupowane w jądrach podstawy mózgu, strukturach limbicznych i korze mózgowej. Neurony kolumny tylnej wysyłają projekcje do wzgórza, jąder podwzgórza i kory przedczołowej [Fibiger i wsp. 1982].

Na podstawie badań histochemicznych przy użyciu znakowanej acetylocholinoesterazy wyróżniono osiem podstawowych ugrupowań neuronów cholinergicznym w o.u.n.: Ch1 – neurony związane z przysrodkowym jądrem



Rysunek 1. Rozmieszczenie zgrupowań neuronów cholinergicznyc w o.u.n. oraz główne projekcje [Woolf 1991]

przegrody, Ch2 – z jądrem pionowym wstęgi diagonalnej, Ch3 – z odnogą poziomą jądra wstęgi diagonalnej, Ch4 – związane z jądrem podstawnym Meynerta, Ch5 – jądrem konarowo-mostowym, Ch6 – grzbietowo-bocznym jądrem pokrywy, Ch7 – neurony związane z przyśrodkową częścią uzdeczki, Ch8 – neurony w pobliżu jądra bliźniaczego (rys. 1).

Z obszaru Ch1 i Ch2 neurony cholinergiczne wysyłają projekcje do hipokampa, z Ch3 do obszaru opuszki węchowej, z Ch4 do kory mózgowej i ciała migdałowatego, z Ch5 i Ch6 do wzgórza oraz innych struktur, jak: twór siatkowaty, miejsce sinawe, jądro grzbietowe szwu, jądro brzuszne nakrywki, istota czarna, jądra podstawy, limbiczna kora czołowa, a z Ch8 do wzgórka górnego blaszki pokrywy [Yeomans 1995, Mesulam 1995]. Mniej wyraźnie zaznaczone połączenia stwierdzono pomiędzy Ch1, Ch4 i Ch8 a wzgórzem oraz Ch5, Ch6 i korą. W obrębie prążkowiasta stwierdza się wewnętrzne interneurony cholinergiczne oraz projekcje z obszarów Ch4, Ch5 i Ch6, natomiast inne zwoje podstawy, jak: gałka biała, jądra podwzgórze i część zbity substancji czarnej, otrzymują unerwienie cholinergiczne z zewnątrz, szczególnie z obszarów Ch5 i Ch6 [Ehlert i wsp. 1994, Ehlert i wsp. 1995].

ACETYLOCHOLINA – SYNTEZA, ROZKŁAD, SUBSTANCJE MODYFIKUJĄCE PRZEKAŹNICTWO CHOLINERGICZNE

Neuroprzebieżnikami uwalnianymi przez neurony cholinergiczne jest acetylocholina (ACh). Może ona oddziaływać na dwa podstawowe typy receptorów – muskarynowe i nikotynowe, które różnią się mechanizmem odpowiedzi i pełnią odmienne funkcje.

W procesie syntezy i rozpadu acetylocholino biorą m. in. udział dwa enzymy: acetylotransferaza choliny (ChAT) oraz acetylocholinoesteraza (AChE). Pierwszy z nich uczestniczy w końcowym etapie syntezy ACh, czyli acetylowaniu choliny przy udziale acetylokoenzymu A. Enzym ten powstaje w ciele komórki nerwowej i jest transportowany wzdłuż aksonu do jego zakończenia, gdzie znajduje się w dużej ilości w pęcherzykach synaptycznych. Cholina jest przenoszona drogą transportu czynnego z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do aksooplazmy. Połączenie obu substratów w końcowy produkt – acetylocholinę zachodzi w cytoplazmie, po czym większość ACh jest sekwestrowana w pęcherzykach synaptycznych.

Transport choliny do neuronów jest zależny od dwóch różnych układów – o wyso-

kim i niskim powinowactwie do niej. Układ o wysokim powinowactwie jest charakterystyczny dla neuronów. Jego działanie zależy od poziomu zewnątrzkomórkowego sodu. Środkiem hamującym transport choline do neuronu jest hemicholina, natomiast związek o nazwie MKC-231 zwiększa gęstość miejsc o wysokim powinowactwie do choline i przez to pozytywnie moduluje ten proces [Murai i wsp. 1994].

Przebieg cholinergicznego może być modyfikowane przez wpływ na proces syntezy, transportu zsyntetyzowanej acetylocholine w neuronie, wydzielanie neuroprzekaznika, jego rozpad, czy też przez selektywne lub nieselektywne pobudzanie lub blokowanie receptorów. Hamująco na transport i magazynowanie acetylocholine w pęcherzykach synaptycznych wpływa np. wesamikal, który blokuje także wydzielanie acetylocholine.

Degradacja ACh zachodzi przy udziale dwóch cholinesteraz (ChE) – acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE). AChE jest nazywana specyficzną cholinesterazą i występuje w neuronach cholinergicznym, w sąsiedztwie synaps cholinergicznym i innych miejscach związanych z działaniem ACh. Butyrylocholinoesteraza nazywana surowiczą esterazą, czy pseudoesterazą, jest obecna w różnych typach komórek glejowych i satelitarnym, w niewielkiej ilości w zakończeniach komórek nerwowych, a także w osoczu, wątrobie i innych narządach. Obie esterazy mogą hydrolizować acetylocholinę, AChE jest jednak bardziej efektywna od BuChE, mniej wrażliwa na blokowanie związkami fosforoorganicznymi i zdolna do hydrolizy metacholine. Funkcja esteraz może być blokowana w sposób odwracalny lub nieodwracalny. Efekty blokady są związane ze wzmożeniem przekazywania cholinergicznego na skutek zahamowania rozkładu ACh. Nieodwracalną blokadę powodują związki fosforoorganiczne, które w większości są wykorzystywane jako środki owadobójcze i bardzo rzadko w leczeniu miastonii i jaskry [Lefkowitz i wsp. 1991, Taylor 1991]. Odwracalne inhibitory cholin-

esterazy, jak: prostygmina, neostygmina czy takryna znajdują dużo więcej zastosowań.

Klasyczne środki pobudzające lub hamujące przekazywanie cholinergicznego często nie wykazują selektywności względem receptorów muskarynowych i nikotynowych (np. agonistycznie działające estry choline – metacholina i karbachol). Inne, jak betanechol, działają na receptory muskarynowe, a pozostają bez wpływu na nikotynowe. Naturalne alkaloidy (pilocarpina, arekolina, muskaryna) i syntetyczne analogi (oxotremoryna, McN-A-343) mają większe powinowactwo do receptorów muskarynowych, chociaż niektóre z nich w dużych dawkach (np. arekolina) mogą pobudzać także receptory nikotynowe. Antagoniści, jak atropina, skopolamina, blokują receptory muskarynowe wiążąc się kompetytywnie z miejscem dla ACh. Blokadę tę można przełamać zwiększając koncentrację acetylocholine w pobliżu receptorów [Brown 1991].

Regulacja poziomu ACh w układzie nerwowym odbywa się przy udziale kilku mechanizmów [Arneric 1994]:

-
-
- presynaptycznym receptorów nikotynowych,
 - hamujących, presynaptycznym, receptorów M2,
 - receptorów 5-HT3,
 - cholinesteraz.
-
-

RECEPTORY MUSKARYNOWE

Na podstawie badań farmakologicznym z użyciem selektywnym ligandów udało się wyróżnić trzy typy receptorów muskarynowych (M_1 - M_3), natomiast technika rekombinacji DNA pozwoliła na ustalenie pięciu odmiennym aminokwasowym sekwencji molekularnym (m_1 - m_5), które prawdopodobnie mogą odpowiadać podtypom receptora w kategoriach farmakologicznym.

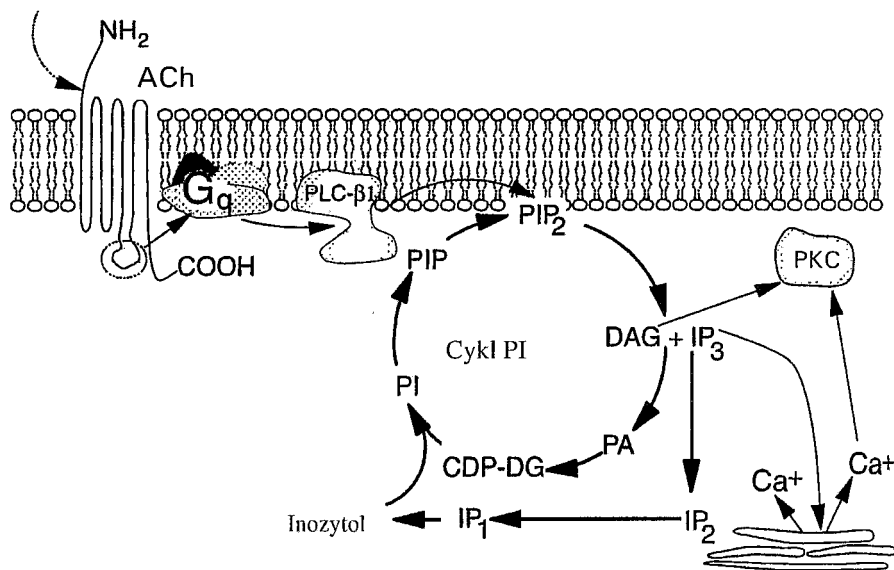
Wszystkie receptory muskarynowe są zbudowane wg planu charakterystycznego

dla receptorów metabotropowych sprzężonych z białkami G. Trzyczonowa struktura receptorów M nie została jeszcze dobrze poznana. Uważa się, że prawdopodobnie jest analogiczna do struktury opsyn, należących również do rodziny receptorów związanych z białkiem G [Ehlert i wsp. 1995]. W bakteriorodopsynie, trzyczonowa struktura receptora ma kształt alfa-helisy, która przenikając przez błonę komórkową tworzy siedem hydrofobowych domen otaczających centralnie zlokalizowany por [Ehlert i wsp. 1994, Cutler i Sramek 1995]. W receptorze muskarynowym w pobliżu poru znajduje się miejsce wiążące acetylocholinę i inne kompetytywne ligandy. Znaczne podobieństwo sekwencji aminokwasów w obrębie tego miejsca, w różnych podtypach receptorów M, jest prawdopodobnie przyczyną trudności w znalezieniu dla nich związków o wysokiej selektywności.

W receptorze muskarynowym, poza miejscem wiążącym acetylocholinę, wykazano także obecność miejsca allosterycznego, które może modulować działanie kompetytywnych ligandów. Wiąże się z nim gallamina, znana jako bloker receptora muskarynowego mający duże powinowactwo do receptorów w komórkach mięśnia sercowego. Jej duże powinowactwo do receptora M_2 i niewielkie do pozostałych podtypów, sugeruje istnienie różnic w strukturze miejsca allosterycznego w zależności od podtypu receptora M [Ehlert i wsp. 1995].

Poznanie reakcji komórkowych zachodzących po związaniu agonisty pozwoliło podzielić receptory muskarynowe na dwie podstawowe grupy: pierwszą – działającą przez stymulację rozpadu fosfatydyloinozytolu i drugą – przez hamowanie cykazy adenylowej [Ehlert i wsp. 1994, Cutler i Sramek 1995, Ehlert i wsp. 1995, Richelson 1995].

Receptory muskarynowe m1, m3, m5



Rysunek 2. Receptory muskarynowe typu 1, 3, 5 i układ fosfatydyloinozytolu; skróty: ACh – acetylocholina, G_q – białko wiążące GTP, PLC-β1 – fosfolipaza C, PI – fosfatydyloinozytol, PIP₂ – 4,5-dwufosforan fosfatydyloinozytolu, DAG – diacyloglicerol, IP₃ – trójfosforan inozytolu, IP₂ – difosforan inozytolu, IP₁ – monofosforan inozytolu, PA – kwas fosfatydowy, CDP-DG – difosfodiacyloglicerol cytydyny, PIP – monofosforan fosfatydyloinozytolu, PKC – kinaza białkowa C [wg Ehlert i wsp. 1995]

Funkcja receptorów M_1 , M_3 , M_5 związana jest z białkami G i układem fosfatydylinozytolu (PI) (rys. 2). Związanie liganda z receptorem powoduje szereg reakcji: stymulację fosfolipazy C (PLC), odszczepienie kwasu arachidonowego od fosfolipidów błony komórkowej, pobudzenie fosfokinazy C (PKC), (jest to zjawisko, które odgrywa rolę w długotrwałej potencjalizacji synaptycznej i procesach pamięci), mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia, wzrost poziomu cyklicznego adenozynomonofosforanu, aktywację zależnego od wapnia prądu potasowego i chlorkowego. Pobudzenie receptorów M_1 i M_3 powoduje również zahamowanie wolnego prądu potasowego, zwanego prądem „m”, prowadzące do przedłużenia pobudzenia neuronów w obrębie kory mózgowej, z którym związana jest desynchronizacja zapisu EEG. Receptory M_2 i M_4 działają przez hamowanie cykazy ade-

nylowej i stymulację dośrodkowego prądu potasowego, ich aktywacja nie prowadzi do zmian w metabolizmie fosfolipidów [Birdsall i Hulme 1983, Cutler i Sramek 1995, Ehlert i wsp. 1995, Richardson 1995].

Farmakologiczna klasyfikacja receptorów M została oparta na różnicach w powinowactwie dla antagonistów – pirenzepiny [Hammer i Giachetti 1982, Barlow i wsp. 1985, Ehlert i wsp. 1994, Cutler i Sramek 1995] i ontezepadu [Cutler i Sramek 1995]. Pozwoliły one wyróżnić trzy, a według niektórych autorów cztery, podtypy receptora M: M_1 o wysokim powinowactwie dla pirenzepiny i niskim dla ontezepadu, M_2 o wysokim powinowactwie dla ontezepadu i niskim dla pirenzepiny, oraz M_3 i M_4 reprezentujące pośrednie powinowactwa dla tych ligandów. Podział na poszczególne podtypy receptorów wraz z odpowiednimi agonistami i antagonistami został przedstawiony w tabl. 1

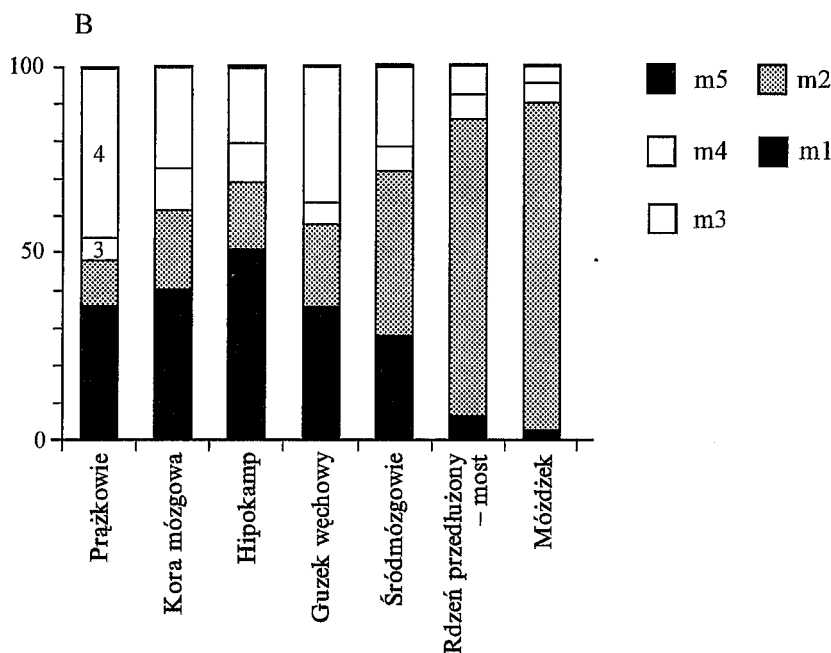
Tablica 1. Typy receptorów muskarynowych, selektywni agoniści i antagoniści, rozmieszczenie [zmodyfikowane wg Ehlert i wsp. 1995 i Kostowskiego 1996]

Typ receptora	M_1	M_2	M_3	M_4
Powinowactwo antagonistów do receptora				
Pirenzepina	+++	+	++/+	++/+
Ontezeпад	++/+	+++	+	++/+
4-DAMP	+++	+	+++	+++
HHSiD	+++	+	+++	+++
Metoktramina	++	+++	+	++
Himbacyna	+++	+++	+	+++
Agoniści	BM-5	RS-86		
	xanomielina			
	RS-86	SDZ BOP 086		
	SDZ BOP 086			
Główna lokalizacja	mózg (zwoje autonomiczne)	serce (mięśnie gładkie)	gruczoły zewnątrzwydzielnicze	mózg (płuca)
Lokalizacja w mózgu	kora, hipokamp	wzgórze, pień mózgu, most, mózdzek	mała gęstość w przodomózgowiu	prążkowie, guzek węchowy, jądro półleżące

4-DAMP – 4-difenyloacetoksy N-metylpiperidyna methiodide

HHSiD – heksahydrosila-difenidol

Powinowactwo do receptora: +++ – wysokie, + – niskie, ++ – pośrednie



Rysunek 3. Dystrybucja podtypów receptorów muskarynowych w różnych obszarach mózgu oznaczona metodą immunoprecypitacji ze znakowanymi przeciwciałami [wg Ehlert i wsp. 1995]

[Mash i Potter 1986, Ehlert i wsp. 1994, Shannon i wsp. 1994, Cutler i Sramek 1995, Kostowski 1996].

Receptory muskarynowe w komórkach znajdują się zarówno postsynaptycznie (M_1 , M_3 , M_4) jak i presynaptycznie (M_2). Różna jest także lokalizacja narządowa tych receptorów. Typ pierwszy występuje najczęściej w obrębie ośrodkowego układu nerwowego i zwojach autonomicznych, typ drugi – w miokardium ssaków i mięśniach gładkich, typ trzeci w gruczołach egzokrynych, typ czwarty w mózgu [Ehlert i wsp. 1995, Mesulam 1995, Richelson 1995, Yeomans 1995]. Receptory M_5 , które udało się sklonować, stanowią poniżej 2% ogółu receptorów muskarynowych i również występują w o.u.n. [Ehlert i wsp. 1995, Yeomans 1995].

Rozmieszczenie receptorów muskarynowych w mózgowiu badano przy pomocy metod autoradiograficznych [Mash i Potter 1986, Ehlert i wsp. 1995], znakowanych przeciwciał oraz oceny obecności mRNA

dla poszczególnych podtypów. Wszystkie przyniosły podobny wynik. Poniżej zamieszczono schemat przedstawiający gęstość poszczególnych typów receptorów M w różnych obszarach mózgu [Ehlert i wsp. 1995] (rys. 3).

W o.u.n. receptory muskarynowe są związane z procesami uczenia się, pamięci, odczuwania emocji, kontroli postawy ciała i aktywności ruchowej, odczuwania bólu.

RECEPTORY NIKOTYNOWE

Receptory nikotynowe (nAChR) należą do grupy receptorów jonotropowych, podobnie jak receptor GABA, czy NMDA [Arneric i wsp. 1995]. Są obecne w o.u.n., mięśniach i zwojach autonomicznych. Tworzą heterogenną grupę podtypów będących kombinacją homologicznych podjednostek kodowanych przez przynajmniej szesnaście różnych genów (alfa1-alfa9; beta1-beta4; gamma, delta i epsilon). Początkowo pozna-

no strukturę receptora nikotynowego występującego w mięśniach (N_1). Stwierdzono, że może być złożony z podjednostek: alfa, beta, gamma (płody), delta i epsilon (dorośle osobniki). W skład receptora wchodzi zawsze pięć podjednostek: dwie alfa i po jednej beta1, delta i gamma lub epsilon [Arneric i wsp. 1995, Decker i wsp. 1995, Lukas i wsp. 1996, Wonnacott 1997]. Każda podjednostka składa się z hydrofilowego końca aminowego (NH_2), czterech hydrofobowych segmentów (M1-M4) przechodzących przez błonę komórkową oraz długiej wewnątrzkomórkowej pętli pomiędzy M3 i M4. Segmenty M2 każdej podjednostki otaczają kanał jonowy. Pobudzenie receptora nikotynowego odbywa się po związaniu dwóch cząsteczek acetylcholin i prowadzi do otwarcia kanału jonowego, którym – w przeciwieństwie do receptorów glicynowych i GABA – jest przewodzony prąd kationowy (rys. 4).

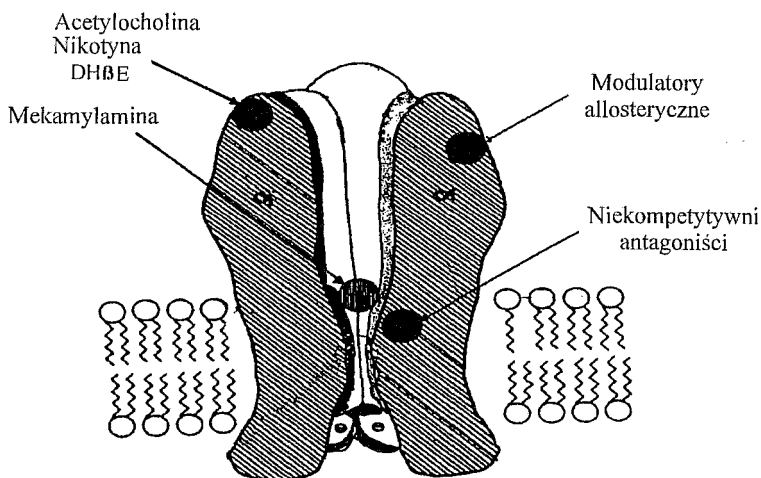
Neuronalny typ receptora nikotynowego (dawniej N_2), występuje w o.u.n. oraz w zwojach układu autonomicznego. Zazwyczaj w zwojowych receptorach nikotynowych występują podjednostki alfa3, alfa7, beta4 i rzadko alfa5, a w nAChR w o.u.n. podjednostki alfa3, alfa4, alfa7, beta2, beta4.

Sklonowana podjednostka alfa9 jest składową nowego typu neuronalnych nAChR [Lukas i wsp. 1996, Elliott i wsp. 1996], jej obecność stwierdzono także w zakończeniach czuciowych i gruczołach wydzielania wewnętrznego [Wonnacott 1997].

Podobnie jak w przypadku receptora „mięśniowego”, nAChR typu neuronalnego składa się z pięciu podjednostek, w tym przynajmniej dwóch alfa. Pobudzenie tego receptora powoduje napływ kationów do wnętrza komórki.

W obrębie neuronalnego nAChR znajduje się kilka miejsc wiążących ligandy:

- *miejsce dla ligandów cholinergicznyc* – pomiędzy podjednostkami alfa i beta (szczególnie ważne są miejsca: od końca NH_2 do pozycji 84 – determinuje wrażliwość na agonistę i sekwencja 195–215 determinująca wrażliwość na agonistów i antagonistów),
- *miejsce alternatywne dla „aktywatorów kanału”* (przez nie działają fizostygmina i gallantamina w mechanizmie niezależnym od hamowania cholinesterazy, tu mogą też działać modulatory kanału jak (+)-2-metylpiperidyna),



Rysunek 4. Receptor nikotynowy – miejsca wiązania ligandów (DHβE – dihydro-β-erytroidyna)

- *miejsca wiązania ligandów antagonizujących funkcje receptora nikotynowego: miejsce dla niekompetytywnych blokerów* – prawdopodobnie antagoniści niekompetytywni działają przynajmniej w dwóch miejscach odmiennych od miejsc dla antagonistów kompetytywnych; efektem związania antagonisty z pierwszym miejscem jest szybka odwracalna blokada lub skrócenie czasu otwarć kanału, a ponadto wzrost powinowactwa dla agonistów; związanie antagonisty z drugim miejscem przyspiesza desensytyzację receptora przez przesunięcie równowagi receptorowej na korzyść stanu niewrażliwości. Ostatnie badania donoszą, że oba te miejsca znajdują się na powierzchni komórki pomiędzy lipidami błony komórkowej a białkiem receptora. Stąd też funkcję nAChR mogą modyfikować substancje lipidowe, jak: kwasy tłuszczowe, detergenty, anestetyki ogólnie działające i inne. Kolejnym jest *miejsce wiązania steroidów* (steroidy podawane przewlekle powodują tolerancję na nikotyne, podawane razem z nikotyne przyspieszają rozwój tolerancji na nią, oddziałując w allosterycznym miejscu odmiennym od wiążącego ACh) [Robinson i wsp. 1996].
Następnie, *miejsce wiążące dihydropirydyny* (związanie pochodnych dihydropirydyny blokuje dośrodkowy prąd sodowy, co ogranicza depolaryzację potrzebną do zainicjowania dośrodkowego prądu wapniowego) [Arneric 1994, Arias 1996].
- *antagoniści* – d-tubokuraryna, gallamina, alfa-neurotoksyna, dihydro- β -erytrody-na, erysodina, metylokakonityna – wiążą się kompetytywnie z miejscem dla agonisty, ale nie aktywują kanału [Harvey i wsp. 1993],
- *niekompetytywne inhibitory kanału* – anestetyki miejscowe, steroidy, historionikotoksyna, chlorisondamina, mekamylamina – blokują kanał bez współzawodniczenia z agonistami i antagonistami kompetytywnymi o miejsce wiązania [Maelicke i Albuquerque 1996],
- *pozytywne modulatory allosteryczne* – niekompetytywne aktywatory kanału jonowego (np. fizostygmina [Maelicke i Schratzenholz 1995].

Podział ten nie odzwierciedla w pełni rzeczywistości, ponieważ wiele ligandów wywołuje niekiedy przeciwstawne efekty w zależności od podtypu receptora, z którym się wiążą, a dokładniej jego składu podjednostkowego, np. (-) nikotyne, która jest znana z agonistycznego działania na nAChR ($\alpha 4\beta 2$), może powodować blokadę homomerycznego receptora zbudowanego z pięciu podjednostek alfa9, podobnie (-)cytyzyna działa jako agonista na receptor zawierający podjednostkę beta4, jest natomiast antagonistą wobec receptorów, w których skład wchodzi podjednostka beta2. Powyższe informacje pozwalają na wniosek, że agonizm lub antagonizm poszczególnych ligandów jest w dużym stopniu związany ze strukturą trzeciorzędową receptora [Arneric i wsp. 1995].

Chociaż badania molekularne przyniosły informacje pozwalające na wyróżnienie dużej liczby podtypów neuronalnych nAChR, badania z użyciem znakowanych ligandów pozwoliły na wyróżnienie trzech podstawowych podklas:

Ligandy wiążące się z receptorami nikotynowymi można podzielić na cztery podstawowe grupy:

- *acetylocholina i agonisci* – nikotyne, karbamyllocholina, 1,1-dimetyl-4-fenyl-piperazyna (DMPP) – przejściowo aktywują kanał kationowy, działają jako czynniki depolaryzujące,
- o wysokim powinowactwie do (-) nikotyne, oznaczane na podstawie wiązania [^3H]acetylocholina, [^3H]nikotyne, [^3H]cytyzyny i [^3H]metylokarbamyllocholina,

- rozpoznające alfa-bungarotoksynę (alfa-BgT),
- wykazujące selektywność wobec neuronalnej bungarotoksyny (n-BgT) [Clarke 1995, Ehlert i wsp. 1995].

Dystrybucja mRNA dla podjednostek nikotynowego receptora neuronalnego w o.u.n. koreluje z rozmieszczeniem miejsc o wysokim powinowactwie dla nikotyny/ACh i alfa-bungarotoksyny [Clarke 1995]. Miejsca o wysokim powinowactwie do (-)nikotyny odpowiadają rozmieszczeniu kombinacji podjednostek alfa4 beta2, natomiast dystrybucja podjednostki alfa7 odpowiada miejscom o wysokim powinowactwie wobec alfa-bungarotoksyny. Podobną korelację stwierdza się również dla podjednostki alfa3 i miejsc rozpoznających neuronalną bungarotoksynę (tabl. 2).

Dystrybucja receptorów nikotynowych w mózgu dorosłego człowieka została opracowana na podstawie ekspresji mRNA dla poszczególnych podjednostek [Court i Clementi 1995]. Jest ona do pewnego stopnia odmienna od przedstawionego wyżej rozmieszczenia podjednostek i miejsc wiążących znakowane ligandy u szczurów: we wzgórzu stwierdzono dużą gęstość miejsc wiążących nikotyne – szczególnie w bocznym jądrze kolankowatym (wysoki poziom mRNA dla podjednostki alfa3; nAChR postsynaptyczne) i w przeciwieństwie do obserwacji u szczurów brak mRNA dla podjednostki beta2.

W prążkowiu wykazano porównywalną gęstość miejsc wiążących nikotyne jak we wzgórzu, oraz obecność mRNA dla podjednostek beta2 i alfa7, i brak mRNA dla alfa3. W istocie czarnej wiązanie nikotyny

Tablica 2. Rozmieszczenie podjednostek receptorów nACh w o.u.n. szczura [Arneric i wsp. 1995]

Region	Wiązanie liganda (R)		Dystrybucja podjednostek neuronalnych nAChR										Wiązanie liganda (H)	
	nikotyna	BgT	alfa2	alfa3	alfa4	alfa5	alfa6	alfa7	beta2	beta3	beta4	nikotyna	BgT	
Przodomózgowie														
Kora	+++	++	(+)	++	+++	+	-	+	+	-	+	+	++	
Hipokamp	+	+++	(+)	+	++	++	-	+++	++	-	++	(+)	++	
Wzgórze	+++	(+)	-	++	+++	-	++	+	+++	++	++	+++	++	
Podwzgórze	+	+++	-	(+)	+	-	+	++	+	-	+			
Ciało migdałowe	++	(+)	-	(+)	++	-	+	-	+	-	(+)			
Przegroda	++	(+)	-	++	-	-	+	+	-	(+)				
Pień mózgu														
Jądra ruchowe	++	-	-	+++	+	-	-	-	++	+	++			
Miejsce sinawe	++	++	-	+++	(+)	-	+	-	++	-	+			
Jądro międzikonarowe	+++	+++	+++	+	+	++	-	-	++	-	++			
Mózdzek	(+)	(+)	-	-	++	(+)	-	+	++	-	(+)			
Kora	+	++	-	+	+	-	-	++	++	-	+	-	-	

- brak obecności, (+) - bardzo mało, ++ - mało, +++ - średnia gęstość, ++++ - bardzo dużo,
R - szczury, H - ludzie, BgT - (-bungarotoksyna

jest wysokie w obrębie części zbitiej (prawdopodobnie miejsca wiążące nikotynę znajdują się tu na komórkach dopaminergicznych), niskie w części siatkowatej, ponadto wiąże się tu alfa-bungarotoksyna, co świadczy o obecności podjednostki alfa7. Hipokamp jest strukturą niejednorodną pod względem wiązania nikotyny. Większość receptorów nikotynowych jest tu związana z neuronami niecholinergicznymi. Duża koncentracja miejsc wiążących nikotynę jest stwierdzana w obszarze CA1/2, średnia w zakręcie zębatym, niska w CA3. Rozmieszczenie miejsc dla alfa-bungarotoksyny jest odmienne: największa ich gęstość występuje w obszarze CA1, pośrednia w CA2/3 i niska w korze śródwęchowej. W nowej korze miejsca o wysokim powinowactwie do nikotyny są w mniejszej liczbie niż w korze śródwęchowej. W mózdku wiązanie nikotyny i alfa-bungarotoksyny jest niewielkie (tabl. 2).

W procesie rozwoju osobniczego, starzenia się i zaburzeń otępiennych, liczba nikotynowych receptorów cholinergicznycych ulega zmianom. U 22-27-tygodniowych płodów poziom miejsc o wysokim powinowactwie dla nikotyny jest najwyższy i wykazuje tendencję spadkową natychmiast po urodzeniu (np. w hipokampie) lub utrzymuje się w stanie niezmiennym w ciągu całego życia (kora czołowa i śródwęchowa). W okresie prenatalnym poziom wiązania nikotyny jest również wysoki w jądrach pnia mózgu, co tłumaczy podatność noworodków na toksyczne działanie nikotyny. Badania na kulturach komórkowych sugerują udział receptorów nikotynowych w kontroli rozwoju neuronów i stabilizacji połączeń synaptycznych. Liczba receptorów nikotynowych w korze mózgowej i hipokampie maleje stopniowo w trakcie starzenia się organizmu. Proces ten ulega jednak dramatycznemu przyspieszeniu w warunkach patologicznych związanych z otępieniem, np. w chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona, czy otępienia związanego z występowaniem ciałek Lewy'ego [Court i Clementi 1995].

Receptory nikotynowe w o.u.n. występują postsynaptycznie i presynaptycznie. Zlokalizowane presynaptycznie mogą pełnić modu-

lującą rolę w mózgu przez wpływ na uwalnianie różnych neuroprzekazników (tabl. 3). Receptory nikotynowe zlokalizowane na neuronach dopaminergicznycych w istocie czarnej są odpowiedzialne za stymulację uwalniania dopaminy w prążkowie po pobudzeniu ich agonistą (nikotyna). Pobudzenie receptorów nikotynowych na neuronach noradrenergicznych w miejscu sinawym prowadzi do wzrostu uwalniania noradrenaliny w hipokampie, a na neuronach cholinergicznycych w obrębie uzdeczki przyśrodkowej – acetylocholino w jądrze międzykonarowym. Różny jest skład podjednostkowy nAChRs presynaptycznych i w związku z tym siła agonistycznego lub antagonistycznego działania ligandów jest odmienna w różnych obszarach mózgu [Wonnacott 1997].

Z funkcjonowaniem nAChRs są związane cztery stany konformacyjne:

-
-
- stan spoczynkowy (R) charakteryzujący się niskim powinowactwem do ACh i zamkniętym kanałem jonowym,
 - stan aktywny (A) z otwartym kanałem jonowym i niskim powinowactwem do agonisty oraz
 - dwa stany desensytyzacji (niskiej wrażliwości) (I lub D) z zamkniętym kanałem jonowym i wysokim powinowactwem do agonistów i niektórych antagonistów.
-
-

Receptor w stanie niskiej wrażliwości jest oporny na aktywację agonistą przez czas od milisekund (dla konformacji I) do minuty (dla D). Jest to modulacja allosteryczna. Innym rodzajem trwalszej modulacji funkcji receptorów nikotynowych, jest fosforylacja przez kinazy (zależną od cAMP, kinazę C, kinazę tyrozynową i Ca-kalmodulinową). Proces ten został dobrze poznany dla receptorów mięśniowych, natomiast niewiele jeszcze wiadomo o jego udziale w przypadku neuronalnych receptorów nikotynowych [Arneric i wsp. 1995].

Tablica 3. Lokalizacja presynaptycznych receptorów nikotynowych i efekty fizjologiczne ich pobudzenia [Role i Berg 1996]

Lokalizacja presynaptycznych receptorów nikotynowych	Źródło włókien cholinergicznyc	Efekt aktywacji presynaptycznych receptorów nikotynowych	Podtyp receptora nikotynowego
Zakończenia neuronów glutamatergicznych w jądrze międzykonarowym	jądro uzdeczki przyśrodkowej, wstęga diagonalna, jądro boczno-grzbietowe nakrywki	zwiększenie spontanicznego i stymulowanego uwalniania kwasu glutaminowego	miejsca wiążące α -bungarotoksynę (α -BgT), zawierające $\alpha 7$
Zakończenia GABA-ergiczne w jądrze międzykonarowym		wzrost spontanicznego uwalniania GABA	miejsca o wysokim powinowactwie do nikotyny ($\alpha 4\beta 2??$)
Zakończenia w korze przedczołowej	jądro podstawne, istota bezimienna, pętla soczewkowa	zwiększenie uwalniania aminokwasów pobudzających	miejsca o wysokim powinowactwie do nikotyny ($\alpha 4\beta 2??$)
Zakończenia w pierwotnej korze wzrokowej	zwiększenie spontanicznej i wywołanej aktywności w korze wzrokowej (zwiększenie uwalniania aminokwasów pobudzających)	miejsca o wysokim powinowactwie do nikotyny ($\alpha 4\beta 2??$)	
GABA-ergiczne zakończenia w bocznym jądrze gruszkowatym	lokalne neurony cholinergiczne?	zwiększenie spontanicznego uwalniania GABA	miejsca o wysokim powinowactwie do nikotyny ($\alpha 3\beta 4??$)
Zakończenia cholinergiczne w mózdzku	jądro rdzeniowe nakrywki	zwiększenie uwalniania acetylocholin	miejsca o wysokim powinowactwie do nikotyny ($\alpha 4\beta 2??$)
Włókna noradrenergiczne i glutamatergiczne w hipokampie	jądro przyśrodkowe przegrody, pionowa wstęga diagonalna	zwiększenie uwalniania/przebieżności noradrenergicznego i glutamatergicznego	miejsca o wysokim powinowactwie do nikotyny i α BgT
Zakończenia cholinergiczne w zwojach sympatycznych	brzusne motoneurony rdzenia	zwiększenie spontanicznego i wywołanego uwalniania (przebieżności) acetylocholin	blokowane przez (BgT, zawierające $\alpha 7$

Z procesami odczucia – desensytyzacji jest związana reakcja na przewlekłe pobudzanie receptorów nikotynowych agonistą. Zamiast oczekiwanej *down-regulation* receptorów, długotrwałe podawanie nikotyny prowadzi do wzrostu liczby wiązań dla nikotyny i alfa-bungarotoksyny w mózgu [Pauly i wsp. 1996]. Efekt ten jest paradoksalny, ponieważ można by się go spodziewać po przewlekłym

podawaniu antagonisty. Opisane zjawisko tłumaczy się przetrwałą desensytyzacją receptorów nikotynowych w o.u.n.. Agonista, powodując desensytyzację porównywalną z blokowaniem receptora antagonistą, prowadzi do kompensacyjnego wzrostu liczby receptorów. Wzrost liczby wiązań znakowanej nikotyny obserwowany jest także po przewlekłym podawaniu antagonistów kompetytywnych

(dihydro- β -erytroidyna – DH β E) i niekompetytywnych (mekamylamina). Jednoczesne podawanie agonisty i niekompetytywnego antagonisty powoduje nasilenie efektu up-regulation, natomiast jednoczesne podawanie agonisty z antagonistą kompetytywnym prowadzi do osłabienia tego zjawiska.

Wzrost liczby receptorów nikotynowych prawdopodobnie nie jest związany ze wzrostem poziomu mRNA dla poszczególnych podjednostek receptora, co świadczy o tym, że białka receptorowe nie są syntetyzowane *de novo*, a ich zwiększona ilość może być wynikiem wzrostu wydajności procesu translacji, nasilonego uaktywniania receptorów nieczynnych, czy zwolnienia degradacji białek receptora [Peng i wsp. 1994, Lukas i wsp. 1996]. Wiele pytań związanych z *up-regulation* receptora nikotynowego ciągle pozostaje nie rozwiązanych. Nie wiadomo, czy w jednakowym stopniu dotyczy ona wszystkich receptorów nikotynowych, jakie znaczenie ma lokalizacja tych receptorów, czy zawsze towarzyszy jej desensytyzacja receptora. Eksperymenty Reavilla i Stolermana [1990] oraz Whiteakera i wsp. [1995], w których oceniano zmiany w aktywności lokomotorycznej po wielokrotnym podawaniu nikotyny i jej agonistów, przemawiają za możliwością wzrostu wrażliwości receptorów nikotynowych, niestety jednak nie wyjaśniają do końca tego problemu [Collins i Marks 1996].

Poznanie mechanizmów zmian wrażliwości receptorów nikotynowych może mieć istotne znaczenie w leczeniu uzależnienia od tytoniu, a także terapii chorób otępiennych przy pomocy agonistów cholinergicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Arias H.G.: Luminal and non-luminal non-competitive inhibitor binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor (review). *Molecular Membrane Biology* 1996, 13, 1–17.
2. Arneric S.P., Williams M.: Nicotinic agonists in Alzheimer's disease: does the molecular diversity of nicotine receptors offer the oppor-

- tunity for developing CNS-selective cholinergic channel activators? *Recent Adv. Treatment Neurodegener. Dis. Cogn. Dysfunction* 1994, 7, 58–70.
3. Arneric S.P., Sullivan J.P., Williams M.: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. W: Bloom F.E., Kupfer D.J. (red.): *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York 1995, 95–110.
4. Barlow R.B., Shepherd M.K.: A search for selective antagonists at M2 muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* 1985, 85.
5. Birdsall N.J.M., Hulme E.C.: Muscarinic receptor subclasses. *Trends Pharmacol. Sci.* 1983, 11, 459–463.
6. Brown J.H.: Atropine, scopolamine, and related antimuscarinic drugs. W: Goodman Gilman A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. (red.): *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, Singapore 1991, 150–165.
7. Clarke P.B.S.: Nicotinic receptors and cholinergic neurotransmission in the central nervous system. *Ann. NY Acad. Sci.* 1995, 757, 73–83.
8. Collins A.C., Marks M.J.: Are nicotinic receptors activated or inhibited following chronic nicotine treatment? *Drug Development Research* 1996, 38, 231–242.
9. Court J., Clementi F.: Distribution of nicotinic subtypes in human brain. *Alzheimer Dis. Ass. Dis.* 1995, 9, 6–14.
10. Cutler N.R., Sramek J.J.: Muscarinic M1-receptor agonists. *CNS Drugs* 1995, 3, 467–481.
11. Decker M.W., Brioni J.D., Bannon A.W., Arneric S.P.: Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life Sci.* 1995, 8, 545–570.
12. Ehlert F.J., Roeske W.R., Yamamura H.I.: Muscarinic receptors and novel strategies for the treatment of age related brain disorders. *Life Sci.* 1994, 55, 2135–2145.
13. Ehlert F.J., Roeske W.R., Yamamura H.I.: Molecular biology, pharmacology, and brain distribution of subtypes of the muscarinic receptor. W: Bloom F.E., Kupfer D.J. (red.): *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York 1995, 111–124.
14. Elliott K.J., Ellis S.B., Berckhan K.J., Urrutia A., Chavez-Noriega L.E., Johnson E.C.,

- Velicelebi G., Harpold M.M.: Comparative structure of human neuronal $\alpha 2$ - $\alpha 7$ and $\beta 2$ - $\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor subunits and functional expression of the $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ and $\beta 4$ subunits. *J. Mol. Neurosci.* 1996, 7, 217–228.
15. Fibiger H.C.: The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Res. Rev.* 1982, 4, 327–388.
16. Hammer R., Giachetti A.: Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2 biochemical and functional characterization. *Life Sci.* 1982, 31, 2991–2998.
17. Harvey S.C., Maddox F.N., Luetje Ch.W.: Multiple determinants of dihydro-beta-erythroidine sensitivity on rat neuronal nicotinic receptor α subunit. *J. Neurochem.* 1993, 67, 1953–1959.
18. Isokawa M., Mello L.E.: NMDA receptor mediated excitability in dendrically deformed dentate granule cells in pilocarpine-treated rats. *Neurosci. Letters* 1991, 129, 69–73.
19. Kostowski W.: Neuroprzekazniki i neuromodulatory w o.u.n.. W: Kostowski W., Pużyński S. (red.): *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna*. PZWL, Warszawa 1996, 54–60.
20. Lefkowitz R.J., Hoffman B.B., Taylor P.: Neurohumoral transmission: the autonomic and somatic motor nervous system. W: Goodman Gillman A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. (red.): *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, Singapore 1991, 84–122.
21. Lukas R.J., Ke L., Bencherif M., Eisenhour C.M.: Regulation by nicotine of its own receptors. *Drugs Development Res.* 1996, 38, 136–148.
22. Maelicke A., Albuquerque X.: New approach to drug therapy in Alzheimer's dementia. *Drug Discovery Today* 1996, 1, 53–59.
23. Maelicke A., Schratzenholz A., Storch A., Schroder B., Gutbrod O., Methfessel C., Weber K., Pereira E., Alkondon M., Albuquerque E.X.: Noncompetitive agonism at nicotine acetylcholine receptors; functional significance for CNS signal transduction. *J. Receptor Signal Transduction Res.* 1995, 15, 333–353.
24. Mash D.C., Potter L.T.: Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neurosci.* 1986, 19, 551–564.
25. Mesulam M.M.: Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex, limbic system, basal ganglia, and thalamus of the human brain. W: Bloom F.E., Kupfer D.J. (red.): *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York 1995, 135–145.
26. Murai S., Saito H., Abe E., Masuda Y., Odashima J., Itoh T.: MKC-231, a choline uptake enhancer, ameliorates working memory deficits and decreased hippocampal acetylcholine induced by ethylcholine aziridinium ion in mice. *J. Neural. Transm.* 1994, 98, 1–13.
27. Nicoll R.A.: The septo-hippocampal projection: a model cholinergic pathway. *Trends in Neurosci.* 1985, 12, 533–536.
28. Pauly J.R., Marks M.J., Robinson S.F., Van de Kamp J.L., Collins A.C.: Chronic nicotine and mecamylamine treatment increase brain nicotinic receptor binding without changing $\alpha 4$ or $\beta 2$ mRNA levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 278, 361–369.
29. Peng X., Gerzanich V., Anand R., Lindstrom J.: Nicotine – induced increase in neuronal nicotinic receptors results in a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol. Pharmacol.* 1994, 46, 523–530.
30. Reavill C., Stolerman I.P.: Locomotor activity in rats after administration of nicotinic agonists intracerebrally. *Br. J. Pharmacol.* 1990, 99, 273–278.
31. Richelson E.: Cholinergic transduction. W: Bloom F.E., Kupfer D.J. (red.): *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York 1995, 125–134.
32. Robinson S.F., Grun E.U., Pauly J.R., Collins A.C.: Changes in sensitivity to nicotine and brain nicotinic receptors following chronic nicotine and corticosterone treatments in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996, 54, 587–593.
33. Role L.W., Berg D.K.: Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 1996, 16, 1077–1085.
34. Shannon H.E., Bymaster F.P., Calligaro D.O., Greenwood B., Mitch C.H., Sawyer B.D., Ward J.S., Wong D.T., Olesen P.H., Sheardown M.J., Swedberg M.D.B., Suzdak P.D., Sauerberg P.: Xanomeline: a novel

- muscarinic receptor agonist with functional selectivity for M1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, 269, 271–281.
35. Stolerman I.P., Chandler C.J., Garcha H.S., Newton J.M.: Selective antagonism of behavioral effects of nicotine by dihydro- β -erythroidine in rats. *Psychopharmacology* 1997, 129, 390–397.
36. Taylor P.: Cholinergic agonists. W: Goodman Gillman A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. (red.): *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, Singapore 1991, 122–130.
37. Taylor P.: Anticholinesterase agents. W: Goodman Gillman A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. (red.): *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, Singapore 1991, 131–150.
38. Whiteaker P., Garcha, H.S., Wonnacott S., Stolerman I.P.: Locomotor activation and dopamine release produced by nicotine and isoarecolone in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1995, 116, 2097–2105.
39. Wonnacott S.: Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 1997, 20, 92–98.
40. Woolf N.J.: Cholinergic system in mammalian brain and spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 1991, 37, 475–524.
41. Yeomans J.S.: Role of tegmental cholinergic neurons in dopaminergic activation, antimuscarinic psychosis and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1995, 12, 3–15.

Adres: Dr Halina Sienkiewicz-Jarosz, Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej AM, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa