

Przypuszcza się, że receptor GABA_C jest homooligomerem — zbudowanym z nieznannej liczby podjednostek ρ_1 tworzących kanał chlorkowy. DNA kodujący tę jednostkę został sklonowany przez G. R. Cuttinga i współpracowników w 1991 roku. Sekwencja aminokwasów wchodzących w skład tej podjednostki jest podobna do sekwencji aminokwasów budujących receptor GABA_A i receptor glicynowy (który również jest receptorem jonotropowym związanym z kanałem chlorkowym). Ze znanych podjednostek receptora GABA_A podjednostka β jest najbardziej zbliżona do podjednostki ρ_1 .

mRNA powstały w wyniku transkrypcji cDNA sklonowanego dla podjednostki ρ_1 wstrzyknięty do oocytów *Xenopus* spowodował ekspresję receptora, którego pobudzenie przez GABA wywołało prąd dokomórkowy blokowany przez pikrotoksynę. Dalsza analiza farmakologiczna wykazała, że wytworzony w ten sposób receptor był niewrażliwy zarówno na bikukulinę, jak i barbiturany oraz benzodiazepiny.

Obecność receptorów niewrażliwych na bikukulinę i baklofen stwierdzono u ssaków przede wszystkim w siatkówce, a oprócz tego w niewielkich ilościach w mózdzku, korze mózgowej, wzrokowej przykrywce, jądrze ogoniastym, rdzeniu kręgowym i innych strukturach, a także u niższych kręgowców, owadów i bakterii. Wydaje się, że receptory te są bardziej rozpowszechnione u owadów i bakterii niż u kręgowców. Mogłoby to świadczyć, że są one znacznie starsze ewolucyjnie od receptorów GABA_A i że z nich dopiero rozwinęły się receptory wrażliwe na bikukulinę.

Literatura uzupełniająca

- Bittiger H., Froestl W., Mickel S.J., Olpe H.-R. (1993): GABA receptor antagonists: from synthesis to therapeutic applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 391–394.
- Bowery N.G. (1993): GABA_B receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 109–147.
- Burt D.R., Kamatchi G.L. (1991): GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* 5: 2916–2923.
- Costa E., Guidotti A. (1991): Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. *Life Sci.* 49: 325–344.
- Hindmarch I., Beaumont G., Brañdon S., Leonard B.E. (red.) (1990): *Benzodiazepines: Current Concepts. Biological, Clinical and Social Perspectives.* A Wiley-Interscience Publ., John Wiley & Sons, Chichester.
- Johnston G.A.R. (1993): GABA_C receptors. W: *Progress in Brain Research*, vol. 100, Bloom F. (red.), Elsevier Science B.V. s. 61–65.
- Laurie D.J., Seeburg P.H., Wisden W. (1992): The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J. Neurosci.* 12: 1063–1076.
- Olsen R.W., Tobin A.J. (1990): Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J.* 4: 1469–1480.
- Sieghart W. (1992): GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 446–450.
- Wellis D.P., Werblin F.S. (1995): Dopamine modulates GABA_C receptors mediating inhibition of calcium entry into and transmitter release from bipolar cell terminals in tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 15: 4748–4761.
- Wisden W., Laurie D.J., Monyer H., Seeburg P.H. (1992): The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci.* 12: 1040–1062.

Rozdział 9

Receptory glutaminianergiczne

WOJCIECH DANYSZ, TADEUSZ FRANKIEWICZ,
CHRISTOPHER G. PARSONS

Wprowadzenie • Znaczenie układu glutaminianergicznego • Klasyfikacja receptorów glutaminianergicznych • Receptory typu NMDA • Charakterystyka farmakologiczna • Rola fizjologiczna • Biologia molekularna • Receptory AMPA • Charakterystyka farmakologiczna • Rola fizjologiczna • Biologia molekularna • Receptory kainowe • Charakterystyka farmakologiczna i rola fizjologiczna • Biologia molekularna • Receptory metabotropowe • Charakterystyka farmakologiczna i rola fizjologiczna • Biologia molekularna • Modulacja receptorów glutaminianergicznych jako strategia terapeutyczna

Wprowadzenie

Znaczenie układu glutaminianergicznego

Pierwsze doniesienia o wpływie kwasu glutaminowego na ośrodkowy układ nerwowy (o.u.n.) pojawiły się na początku lat 50. (działanie drgawkowe opisywane przez Hayashi), były one jednak przyjmowane niezwykle sceptycznie. Dużą trudnością było odróżnienie puli metabolicznej od neuroprzebieżnikowej tego aminokwasu. Niepodważalny dowód na rolę neuroprzebieżnikową glutamianu uzyskano dopiero po wprowadzeniu antagonistów receptorów glutaminianergicznych w latach 70.

W o.u.n., podobnie jak w innych narządach, do zachowania homeostazy konieczna jest dynamiczna równowaga antagonistycznych systemów kontrolujących. W mózgu funkcję taką pełnią pobudzający układ glutaminianergiczny i hamujący układ GABAergiczny. Zarówno kwas glutaminowy, jak i GABA pobudzają receptory bezpośrednio związane z kanałami jonowymi, a więc pełnią podstawową rolę w tzw. szybkim przebieżnictwie synaptycznym (np. typowy rdzeniowy łuk odruchowy — <1 s), w przeciwieństwie do innych neuroprzebieżników działających poprzez receptory metabotropowe (związane z układem enzymatycznym), np. dopamina czy noradrenalina. Uznaje się, iż prawie wszystkie neurony mają receptory glutaminianergiczne, co wskazuje na podstawową rolę

fizjologiczną tego systemu. Ponadto kwas glutaminowy może odgrywać istotną rolę w neurotoksyczności. Badacz amerykański John Olney wykazał na początku lat 70., że nadmierna aktywacja receptorów glutaminianergicznych nawet przez endogennych agonistów może w pewnych okolicznościach prowadzić do degeneracji neuronów — proces określany mianem ekscytotoksyczności. Badania funkcji receptorów glutaminianergicznych — rozwijające się gwałtownie w ciągu ostatnich 10 lat — mają znaczenie nie tylko poznawcze, lecz również pragmatyczne. Wydaje się, że uwieńczeniem tych wysiłków będzie (a w pewnym stopniu już jest) możliwość korekcji zaburzeń w obrębie tego układu, a także hamowanie progresji zmian patologicznych.

W celu uproszczenia termin glutaminian (kwas L-glutaminowy) będzie używany jako substytut określenia „aminokwasy pobudzające”. Nie należy jednak zapominać, że rolę neuroprzekaźnika pobudzającego mogą prawdopodobnie pełnić również — chociaż w mniejszym stopniu — inne aminokwasy, takie jak L-asparaginian (L-ASP), *N*-aspartylglutaminian (NAAG), kwas L-homocysteinowy (L-HCA) itp.

Klasyfikacja receptorów glutaminianergicznych

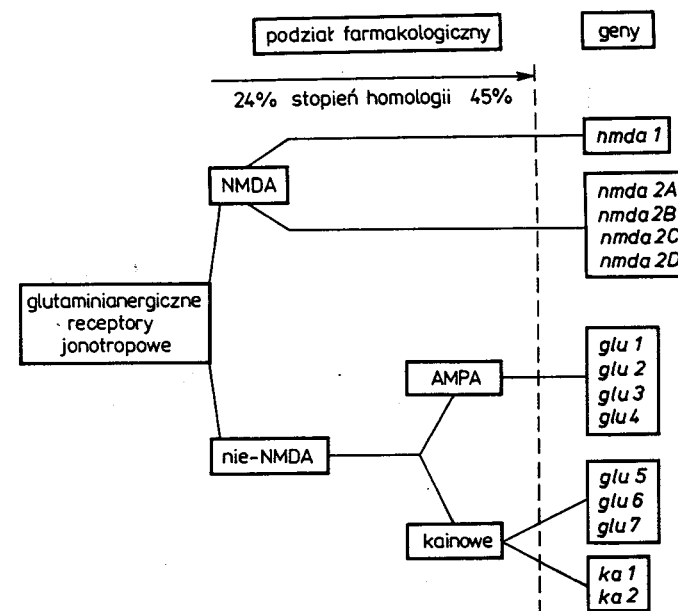
W ciągu ostatnich 15 lat nasza wiedza na temat receptorów glutaminianergicznych ulegała nie tylko stopniowej ewolucji, lecz wielokrotnie zmianom wręcz rewolucyjnym. Przyczyną tych zmian było wprowadzanie nowych selektywnych agonistów, antagonistów i znakowanych ligandów, a w ciągu ostatnich 6 lat również badań molekularnych. Tradycyjnie nazwy receptorów (szczególnie jonotropowych) pochodzą od nazw agonistów. Do systematycznego omówienia roli poszczególnych receptorów został użyty następujący podział, który można uznać za obowiązujący:

Receptory jonotropowe

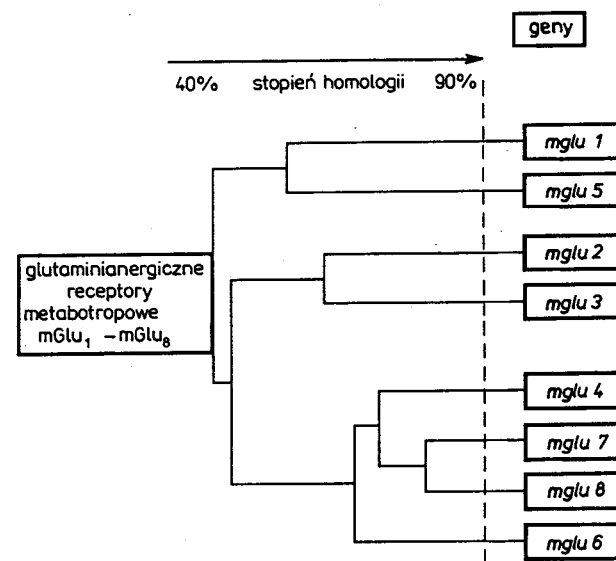
- NMDA (pobudzane przez kwas *N*-metylo-D-asparaginowy; NMDA) — związane z kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla Na^+ , Ca^{2+} i K^+ , charakteryzujące się dużą przewodnością — około 50 pS;
- AMPA (pobudzane przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowy; AMPA) — związane z kanałami jonowymi o przewodności około 10 pS; przepuszczalnymi dla Na^+ , K^+ i w przypadku niektórych podtypów dla Ca^{2+} ;
- kainowe (pobudzane przez kwas kainowy) — związane z kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla Na^+ , Ca^{2+} i K^+ .

Receptory metabotropowe

Związane poprzez białko G z układem wtórnych przekaźników informacji (np. IP_3 , cAMP).



Ryc. 9.1. Schemat filogenezy glutaminianergicznych receptorów jonotropowych oparty na homologii sekwencji aminokwasów. Na schemacie wyszczególniono geny kodujące podjednostki odpowiednich receptorów



Ryc. 9.2. Schemat filogenezy glutaminianergicznych receptorów metabotropowych oparty na homologii sekwencji aminokwasów

Badania molekularne genów odpowiedzialnych za ekspresję receptorów glutaminianergicznych (lub poszczególnych podjednostek tworzących receptor) doprowadziły do bardziej szczegółowego i precyzyjnego podziału, który dopełnia raczej niż podważa wcześniej proponowaną klasyfikację (ryc. 9.1 i 9.2).

Receptory jonotropowe zbudowane są najprawdopodobniej z 5 podjednostek tworzących kanał jonowy (ryc. 9.3, 9.6, 9.8), jednak ich stechiometria *in vivo* nie została jak dotąd poznana. Białka podjednostek z tej rodziny (receptory NMDA, AMPA i kainowe) wykazują pewną homologię w składzie aminokwasów (> 20 %, ryc. 9.1), co wskazuje na ich podobne pochodzenie filogenetyczne. Nieco większa homologia występuje w rodzinie receptorów metabotropowych (ryc. 9.2).

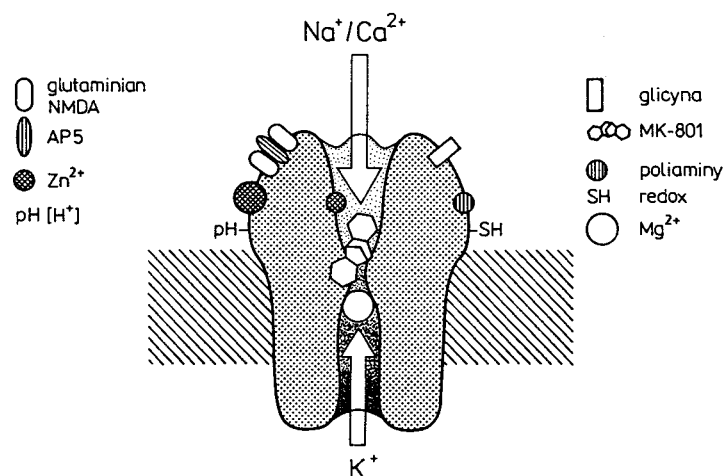
Aczkolwiek receptory glutaminianergiczne badano przede wszystkim w o.u.n., występują one również m.in. w zwojach układu wegetatywnego, w nadnerczach, w śledzionie, w układzie pokarmowym, jednak rola tych receptorów jest jak dotąd bardzo słabo poznana i nie zostały one omówione w niniejszej książce.

Receptory typu NMDA

Charakterystyka farmakologiczna

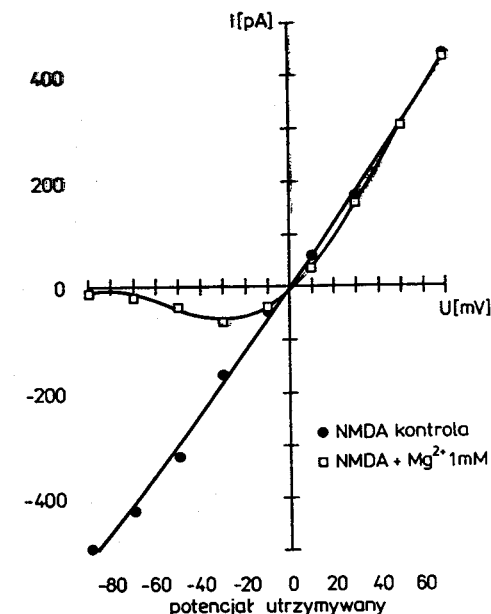
MIEJSCE GŁÓWNEGO NEUROPRZEKAŹNIKA (KWASU GLUTAMINOWEGO)

Uważa się, że do aktywacji receptora NMDA konieczne jest przyłączenie się dwóch cząsteczek agonisty oraz że miejsca wiązania agonisty i antagonisty (wiążące się tylko w jednym miejscu) nie są identyczne, lecz jedynie zachodzące na siebie (ryc. 9.3, 9.4). Głównym agonistą endogennym jest niewątpliwie kwas



Ryc. 9.3. Schemat receptora NMDA uwzględniający miejsca modulujące (dalsze wyjaśnienia w tekście)

Ryc. 9.4. Wykres ilustrujący wpływ potencjału błony komórkowej na blokadę receptora NMDA przez jony magnezowe



L-glutaminowy, jednak nie wyklucza się roli innych substancji, np. kwasu asparaginowego, kwasu chinolinowego czy L-homocysteinowego. Kompetycyjnych antagonistów NMDA (tab. 9.1) można podzielić na dwie grupy: w pierwszej — grupy aminowa i fosforanowa oddalone są o około 5 atomów węgla (AP5, CGP-37849,

Tabela 9.1. Charakterystyka farmakologiczna miejsc rozpoznawczych receptora NMDA

Miejsce wiązania	Agoniści	Antagoniści	Znakowane ligandy
NMDA	kwas L-glutaminowy, NMDA, kwas L-asparaginowy	AP5, AP7, CPP, CGP-37849, CGS-19755, LY-274614, CGP-39653	[³ H]glutaminian, [³ H]CPP, [³ H]CGS-19755, [³ H]CGP-39653
GLY-B	glicyna, D-seryna, D-alanina	5,7-DCKA, L-689,560, MNQX, ACEA-1021, L-701,324	[³ H]glicyna, [³ H]D-seryna, [³ H]5,7-DCKA, [³ H]L-689,560, [³ H]MDL 105,519
	<i>Częściowi agoniści:</i> ACPC, ACBC, (+,R)HA-966, D-cykloseryna, L-687,414		
Poliamin	spermina, spermidyna	arkaina, putrescyna, ifenprodyl, eliprodyl	[³ H]ifenprodyl
	Blokery kanału jonowego		Znakowane ligandy
	(+)-MK-801, ketamina, dekstrorfan, PCP, TCP, memantyna, araksyny		[³ H]MK-801, [³ H]TCP

CGS-19755), w drugiej — o 7 (AP7, CPP, LY-274614). Obie grupy wykazują inną interakcję allosteryczną z miejscem GLY-B receptora NMDA (patrz następny podrozdział). Działają one prawdopodobnie nieco inaczej na podtypy tego receptora, ponieważ odpowiedź elektrofizjologiczna na NMDA w jądrze czerwiennym jest hamowana przez AP5, a nie przez AP7. AP5 i AP7 wykazują u zwierząt laboratoryjnych bardzo słabe działanie po podaniu obwodowym ze względu na znikomą penetrację do mózgu (są to cząsteczki hydrofilne). Nowsze substancje, takie jak CGP-37849 i CPP, charakteryzują się znacznie lepszą penetracją do o.u.n. Należy dodać, iż izomery D antagonistów kompetycyjnych receptora NMDA wykazują znacznie większe powinowactwo niż formy L. Większość wymienionych antagonistów charakteryzuje się dużą selektywnością, tzn. nie działają na inne receptory poza receptorem NMDA.

MIEJSCE GLICYNOWE (GLY-B)

W ciągu ostatnich 9 lat wykryto i udowodniono ponad wszelką wątpliwość, że glicyna, oprócz tradycyjnie przyjętej roli neuroprzekaźnika aktywującego hamujące receptory związane z kanałami Cl^- (np. w rdzeniu kręgowym i pniu mózgu), ma kluczowe znaczenie jako koagonista receptorów NMDA (miejsce oznaczone jako GLY-B) (ryc. 9.3). Termin koagonista wskazuje, że bez stymulacji miejsca GLY-B nie dochodzi do otwierania kanału jonowego, mimo dużych stężeń agonisty NMDA (np. kwasu glutaminowego). W badaniach elektrofizjologicznych wykazano, że glicyna hamuje desensytyzację receptora NMDA (desensytyzacją określa się zmniejszenie typowej reakcji na agonistę pomimo jego obecności). Wielu badaczy uważa, że w warunkach fizjologicznych miejsce GLY-B jest wysyczone przez endogenną glicynę. Stwierdzenie to oparte jest głównie na doświadczeniach wykonanych na skrawkach mózgu, gdzie znaczna ilość glicyny uwalniana jest z uszkodzonej tkanki. Badania *in vivo* wykazują jednak niezbieżnie, że w niektórych strukturach mózgu miejsca glicynowe nie są całkowicie wysyczone — np. obserwowano wyraźne wpływy behawioralne czy biochemiczne po podaniu agonistów GLY-B. Dodatkowym elementem jest fakt, że Zn^{2+} obecny w mózgu i uwalniany razem z kwasem L-glutaminowym z niektórych zakończeń nerwowych zmniejsza allosterycznie powinowactwo glicyny do miejsc GLY-B, podwyższając w ten sposób próg aktywacji. Miejsce GLY-B wykazuje zupełnie odmienną charakterystykę farmakologiczną od hamującego receptora glicynowego. Izomery D seryny i alaniny są silnymi agonistami miejsca GLY-B, izomery L zaś są znacznie słabsze (20–30 razy), działają natomiast preferencyjnie jako agoniści na glicynowy receptor hamujący (GLY-A). Podobnie strychnina będąca antagonistą GLY-B nie działa na miejsce GLY-B. Glicyna jest najprawdopodobniej podstawowym endogennym agonistą tego miejsca (tab. 9.1), aczkolwiek stwierdzono ostatnio obecność dużych stężeń D-seryny w mózgu, co jest zaskakujące biorąc pod uwagę, iż izomery D aminokwasów nie wchodzą w skład białek. Pierwszym odkrytym antagonistą GLY-B był kwas kinureninowy, wykazujący jednak małą selektywność (działanie na receptory AMPA i miejsce NMDA). Jego pochodna, kwas 5,7-dichlorokinureninowy (słabo przechodzący przez barierę krew–mózg) jest

znacznie bardziej selektywny i znalazł zastosowanie w wielu badaniach *in vivo*. Ostatnio zsyntetyzowane jego pochodne, takie jak np. L-701, 324, cechuje znacznie lepsza penetracja do o.u.n. (tab. 9.1). Drugą grupą antagonistów GLY-B są pochodne chinoksaliny, takie jak MNQX (nie penetrujący do o.u.n.) oraz ACEA 1021 wykazujący dobrą przenikalność przez barierę krew–mózg. Oprócz agonistów i antagonistów istnieją częściowi agoniści miejsca GLY-B, jak np. (+,R)HA-966, ACPC, ACBC, D-cykloseryna, a także L-687,414 (tab. 9.1). Częściowym agonistą jest substancja aktywująca receptor (otwieranie kanału) w stopniu mniejszym niż agonista (glicyna, 100% aktywności wewnętrznej), lecz większym niż antagonist (0% aktywności wewnętrznej). Funkcjonalnie działanie częściowego agonisty zależy od stanu aktywacji miejsca GLY-B przez endogenną glicynę: w jej dużym stężeniu częściowy agonista będzie się zachowywać jak antagonist, w małym — jak agonista. Interesujące jest, że *in vivo* niektórzy z częściowych agonistów (ACPC, D-cykloseryna) w małych dawkach aktywują receptor, a w dużych wyraźnie go hamują. Mechanizm tego działania nie jest do końca poznany, jednak najnowsze dane wskazują, że jest to prawdopodobnie związane z hamowaniem receptora NMDA przez tlenek azotu (NO) powstający w wyniku gwałtownego i długotrwałego napływu jonów wapniowych do wnętrza neuronu.

MIEJSCE WIAŻĄCE POLIAMINY

Poliaminy, takie jak spermina czy spermidyna (obecne w mózgu), mają pozytywny modulujący wpływ na receptory NMDA objawiający się wzrostem częstotliwości otwierania kanału jonowego oraz powinowactwa dla glicyny. Aktywacja miejsca poliaminy nie jest konieczna do otwierania kanału receptora NMDA, a całkowite zahamowanie jego aktywności zachodzi jedynie po podaniu odwrotnego agonisty (tzw. związku o ujemnej aktywności wewnętrznej) — 1,10-diaminodekanu. Według niektórych autorów substancja ta nie jest odwrotnym agonistą miejsca poliamin, lecz jej silniejsze od antagonistów działanie hamujące wynika jedynie z blokady kanału jonowego. Poliaminy o krótszych łańcuchach, takie jak arkaina lub putrescyna (prekursor sperminy), mają działanie antagonistyczne na miejsce poliaminowe (tab. 9.1; ryc. 9.3). Fakt, że agoniści miejsca poliaminowego (ifenprodyl lub bardziej selektywny eliprodyl) mają wyraźne działanie *in vivo* (np. neuroprotekcja w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu), wskazuje, że jego endogeni agoniści (spermina, spermidyna) są obecni w stężeniach wystarczających do jego aktywacji. Poliaminy działają pozytywnie modulująco na receptor NMDA w stężeniach około $10 \mu\text{M}$, natomiast w zakresie $100 \mu\text{M}$ mają bezpośrednie działanie blokujące na kanał receptora NMDA (blok zależny od potencjału).

MIEJSCE WIAŻĄCE FENCYKLIDYNĘ (PCP)

W 1958 roku firma farmaceutyczna Parke Davis (USA) wprowadziła fencyklidynę (PCP) jako środek do znieczulenia ogólnego. Wkrótce jednak PCP została wycofana z powodu wyraźnych działań psychozomimetycznych. W tym

czasie mechanizm jej działania nie był znany. Dopiero 20 lat później stwierdzono, że PCP blokuje receptory NMDA (ryc. 9.3, tab. 9.1), co może mieć znacznie dla działania psychozomimetycznego tego związku. Blokada ta charakteryzuje się tym, że jest ona silniejsza, gdy stosuje się większe stężenia NMDA (ang. *use-dependent*). Wynika to z faktu, że PCP jest blokerem kanału jonowego receptora NMDA, a więc uzyskuje dostęp do swojego miejsca rozpoznawczego (wiązania) dopiero przy otwartym kanale (aktywacja). Dlatego też antagonizm związany z działaniem na kanał jonowy receptora NMDA określa się jako bezkompetycyjny (ang. *uncompetitive*), a nie niekompetycyjny (ang. *noncompetitive*). Ten drugi termin odpowiada raczej antagonistom miejsca glicynowego GLY-B. Dodatkową cechą charakterystyczną blokerów kanału NMDA jest zależność stopnia blokady od potencjału błony neuronu — tzn. przy depolaryzacji stopień blokowania słabnie. Wydaje się, że miejsce PCP receptora NMDA najprawdopodobniej nie ma żadnej funkcji fizjologicznej, ponieważ jak dotąd nie wykryto jego endogennego liganda.

Poza PCP na miejsce to działają: jego pochodna TCP, ketamina, dekstrorfan, memantyna, amantadyna, MK-801 i wiele innych związków. MK-801 (dizocylpina) wykazuje zdecydowanie największą selektywność i znalazł już zastosowanie w paru tysiącach opublikowanych badań na temat receptorów NMDA. Wiązanie radioliganda [³H]MK-801 do miejsca PCP ulega nasileniu po stymulacji receptora NMDA (glicyna i kwas glutaminowy), co umożliwia stosowanie metody wiązania receptorowego jako funkcjonalnego parametru aktywacji receptora NMDA. Za pomocą tej metody można odróżnić działanie na poszczególne miejsca modulujące receptor NMDA, a także określić aktywność wewnętrzną i względne powinowactwo badanej substancji.

Działania behawioralne ligandów typu PCP różnią się nieco od działania kompetycyjnych antagonistów NMDA. I tak np. blokery kanału mają silniejszy wpływ na zużywanie glukozy, na metabolizm dopaminy, powodują wyraźną stymulację aktywności ruchowej, a w większych dawkach także silnie zaznaczone zachowania stereotypowe.

MIEJSCE WIĄŻĄCE Mg²⁺

Jedną z najważniejszych cech receptora NMDA jest zależna od potencjału blokada przez jony magnezowe (Mg²⁺). W doświadczeniach elektrofizjologicznych, wykorzystujących technikę *patch clamp*, receptor NMDA aktywowany w środowisku pozbawionym jonów Mg²⁺ wykazuje liniową zależność natężenia prądu jonowego od potencjału błony komórkowej. Bez względu na wartości natężenia tego prądu są prawie jednakowe w zakresie ujemnych i dodatnich potencjałów (ryc. 9.4). Wówczas jonofor zachowuje się jak klasyczny przewodnik prądu. W obecności fizjologicznego stężenia jonów Mg²⁺ (1–2 mM) charakterystyka natężenia prądu przy ujemnych potencjałach błony komórkowej jest nieliniowa, zachowuje natomiast liniowość przy potencjałach dodatnich. Zjawisko to nosi nazwę rektyfikacji. Jak widać na ryc. 9.4, w obecności jonów magnezowych przewodność kanału receptora NMDA przy wartościach bliskich potencjałowi

spoczynkowemu błony komórkowej (ok. –70 mV) jest bliska zeru. Oznacza to, że w takich warunkach nawet w obecności agonisty receptor nie ulega aktywacji, ponieważ błona komórkowa musi najpierw ulec wstępnej depolaryzacji, która powoduje stopniowe usuwanie blokady magnezowej. Przy wartościach około –40 mV Mg²⁺ przestaje być czynnikiem hamującym i kanał uzyskuje pełną przepuszczalność dla jonów.

Opisane powyżej cechy receptora NMDA, który jest w dużym stopniu przepuszczalny dla jonów Ca²⁺, umożliwiają dość precyzyjną kontrolę stężenia tego jonu we wnętrzu komórki. Ilość jonów wapniowych napływających do komórki byłaby proporcjonalna do stopnia depolaryzacji błony komórkowej. Ma to kluczowe znaczenie dla procesów plastyczności synaptycznej, takich jak długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*, LTP), długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *long-term depression*, LTD) czy drgawki rozniecane (ang. *kindling*), gdzie Ca²⁺ pełni podstawową rolę.

MIEJSCE WIĄŻĄCE Zn²⁺

Cynk hamuje aktywację receptora NMDA w sposób dwufazowy, w mniejszych stężeniach (10 μM) działa on poprzez miejsce wiążące znajdujące się na zewnątrz kanału jonowego (allosteryczna interakcja z miejscem GLY-B prowadząca do zmniejszenia powinowactwa), w większych natomiast blokuje kanał jonowy bezpośrednio (ryc. 9.3). Stwierdzono, że Zn²⁺ obecny jest w mózgu w stężeniach wystarczających do interakcji z receptorem NMDA, a ponadto jest on uwalniany z zakończeń glutaminianergicznych szlaku masyjnego (w regionie CA3 hipokampa), co sugeruje, że może mieć także znaczenie funkcjonalne *in vivo*.

MIEJSCE WRAŻLIWE NA POTENCJAŁ OKSYDOREDUKCYJNY

Receptor NMDA jest wrażliwy na zmiany potencjału oksydoredukcyjnego środowiska. Działanie to związane jest z grupami SH, np. cysteiny wchodzącej w skład białka podjednostek tworzących kanał jonowy. Substancje utleniające (np. DTNB) hamują, natomiast redukujące (np. DTT) nasilają funkcję receptora NMDA.

Do modulatorów stanu redoks receptorów NMDA występujących w mózgu można zaliczyć kwas askorbinowy (witamina C), glutation i NO (oraz ogólnie wolne rodniki). NO jest toksyczny jako wolny rodnik, NO⁺ natomiast może mieć działanie neuroprotektoryjne poprzez utlenianie grup SH receptora NMDA.

pH

Zmniejszenie wartości pH w stosunku do poziomu fizjologicznego (7,4) powoduje zahamowanie funkcji receptora NMDA, np. przy zmniejszeniu pH do 6,4 dochodzi praktycznie do jego całkowitego „wyłączenia”. Modulacja ta może mieć znacznie fizjologiczne, np. w niedokrwieniu mózgu (ischemii), gdzie w wyniku niedoboru tlenu dochodzi do zmniejszenia pH zewnątrzkomórkowego. Hamowanie funkcji receptora NMDA jest naturalnym mechanizmem obronnym

przeciwdziałającym napływowi jonów wapniowych do komórek, który ma istotne znaczenie w uszkodzeniu neuronów. Zwiększenie zewnątrzkomórkowego pH, np. do 8,4, nasila aktywację receptora NMDA. Zależność funkcji receptora NMDA od wartości pH wydaje się związana z obecnością aminokwasu histydyny w białku tworzącym kanał jonowy receptora (ryc. 9.3).

ARAKSYNY

Naturalna araksyna ARG 636 (jad pająka) i jej pochodna syntetyczna NPS 102 blokują kanał receptora NMDA w miejscu odrębnym od miejsca PCP. Blokada ta zależy od potencjału błony komórkowej i ma charakter „bezkompetycyjny”.

STEROIDY

Siarczan pregnenolonu, będący podstawowym steroidem o.u.n., nasila funkcję receptora NMDA ($EC_{50}=29 \mu M$, badania elektrofizjologiczne; EC_{50} jest to stężenie substancji, w którym wykazuje ona 50% maksymalnego działania). W badaniach wiązania receptorowego steroid ten zwiększa powinowactwo glutaminianu i glicyny do receptora NMDA. Przypuszcza się, że efekt ten przynajmniej częściowo jest związany z działaniem poprzez inkorporację w błonę komórkową i interakcję z podjednostką kanału, a także z udziałem niezidentyfikowanego czynnika cytoplazmatycznego.

Rola fizjologiczna

Charakterystyczną cechą kanałów związanych z receptorem NMDA jest znaczna przewodność dla jonów wapniowych i sodowych (ryc. 9.3). W niektórych strukturach mózgu (np. rejon CA1 hipokampa) receptor NMDA ulega aktywacji przez kwas glutaminowy dopiero przy odpowiednio intensywnej stymulacji receptorów AMPA i napływie kationów Na^+ do wnętrza neuronu, co niweluje zależny od potencjału blok magnezowy (patrz wcześniej). Ta cecha receptora NMDA, „zamiana” informacji ilościowej na jakościową, czyni go odpowiednim kandydatem do mediowania procesów plastyczności. Faktycznie, receptor NMDA pełni kluczową rolę w plastyczności rozwojowej oraz w procesach uczenia się. Podstawowe znaczenie ma tu napływ dużych ilości jonów Ca^{2+} , który aktywuje wiele enzymów wapniozależnych, takich jak np. kinazy, kalmodulina, kalpains czy fosfolipazy. Osiągnięcie określonego poziomu wapnia jest warunkiem koniecznym do indukcji zjawiska długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (tzw. LTP), obserwowanego w badaniach elektrofizjologicznych, które — jak się powszechnie uważa — przypomina elementarne mechanizmy uczenia się. Stwierdzono, że nieco mniejszy wzrost stężenia jonów wapniowych może wywoływać zjawisko przeciwne — tzn. długotrwałego osłabienia synaptycznego (tzw. LTD), co może podwyższyć próg, przy którym dochodzi do wywołania LTP. Przykład ten wska-

zuje, że jeden rodzaj sygnału (Ca^{2+}) zależnie od stężenia może wywoływać przeciwstawne skutki — hamować lub wzmacniać transmisję synaptyczną. Na poziomie całego organizmu można to sobie wyobrazić jako „filtrowanie” istotnych dla ustroju informacji.

W przeciwieństwie do utrzymującej się przez wiele lat tezy, że receptory NMDA nie biorą udziału w „normalnej” transmisji neuronalnej, stwierdzono, że w niektórych strukturach mózgu receptor ten może uczestniczyć w znacznym stopniu również w powstawaniu zjawiska szybkiego przekąźnictwa synaptycznego (ang. *excitatory post-synaptic potentials*, EPSP). Jest to prawdopodobnie konsekwencją różnic funkcjonalnych między podtypami receptorów NMDA (np. wrażliwość na magnez) lub różnego potencjału spoczynkowego danego neuronu. Komponenta związana z receptorem NMDA w EPSP wzrasta znacznie wolniej niż związana z receptorem AMPA, trwa natomiast znacznie dłużej, tzn. setki milisekund (AMPA kilka milisekund). Wynika to z faktu, że powinowactwo kwasu L-glutaminowego do receptora NMDA jest większe, w związku z czym dłużej trwa jego „połączenie” z miejscem rozpoznawczym. Udział receptorów NMDA w „normalnej” transmisji potwierdzają badania behawioralne, w których obserwuje się widoczne skutki nie związane z uczeniem (ataksja, zaburzenia koordynacji, wzrost aktywności ruchowej itp.) po podaniu niektórych antagonistów receptora NMDA.

Przyjęto, że receptory NMDA występują przede wszystkim postsynaptycznie, są jednak przykłady ich lokalizacji presynaptycznej — np. na zakończeniach pierwotnych włókien aferentnych w rdzeniu kręgowym, gdzie 70% tych receptorów jest umiejscowionych na neuronach glutaminianergicznych, a zatem mogą być określane jako presynaptyczne autoreceptory.

Receptory NMDA są szeroko rozmieszczone w o.u.n., jednak najwięcej występuje ich w hipokampie (CA1), korze mózgowej, jądrach podstawy, przegrodzie i jądrze migdałowatym (znakowanie receptorowe).

Poza opisaną powyżej rolą fizjologiczną receptory NMDA, a pośrednio jony wapniowe, mają kluczowe znaczenie w procesie ekscytotoksyczności — neurodegeneracji wynikającej z nadmiernej aktywacji receptora. Wykazano na przykład, że w niektórych modelach niedokrwienia mózgu uszkodzenie pojawia się najpierw w polu CA1 hipokampa — warstwie zawierającej największą gęstość receptorów NMDA. Wydaje się, że jest to związane z następującymi cechami receptora NMDA:

1. Duża przewodność dla jonów Ca^{2+} .

2. Częściowa depolaryzacja powoduje usuwanie bloku magnezowego. Depolaryzacja może być skutkiem działania na receptory AMPA lub niedoboru energetycznego uniemożliwiającego utrzymanie równowagi jonowej.

3. W przeciwieństwie do kanałów jonowych zależnych od potencjału błonowego (np. kanały wapniowe), receptory NMDA nie wykazują mechanizmu „wylączającego” przy określonym progu depolaryzacji. Jedynym sposobem deaktywacji jest dysocjacja agonisty (kwasu glutaminowego) i „wylapanie” go poprzez glejowy lub neuronalny mechanizm wychwytu zwrotnego (ang. *reuptake*).

Według obecnie panujących poglądów do ekscytotoksyczności może również dochodzić bez wzrostu stężenia agonisty (kwasu glutaminowego), jeżeli wrażliwość postsynaptyczna na aktywację rośnie poprzez:

- 1) wzrost wrażliwości receptorów (np. zwiększenie gęstości receptorów, spadek wrażliwości na magnez, zmniejszenie desensytyzacji),
- 2) defekt mechanizmów buforujących lub usuwających jony wapniowe z komórki,
- 3) wzrost wrażliwości wewnątrzkomórkowych enzymów na wapń,
- 4) niedobór energetyczny (np. zaburzenia funkcji mitochondriów, niedobór tlenu i glukozy) prowadzący do częściowej depolaryzacji.

Jak wspomniano wcześniej, oprócz kwasu glutaminowego jednym z kandydatów na agonistę receptorów NMDA jest kwas chinolinowy. W latach 80. zauważono, że podanie kwasu chinolinowego do prądkowia powoduje neurodegenerację bardzo przypominającą typ zmian patologicznych obserwowany w chorobie Huntingtona. Wprawdzie stężenie kwasu chinolinowego w mózgu jest relatywnie małe, nie można jednak wykluczyć, że wzrasta ono znacznie w niektórych stanach patologicznych oraz że zwiększa się wrażliwość na tego agonistę.

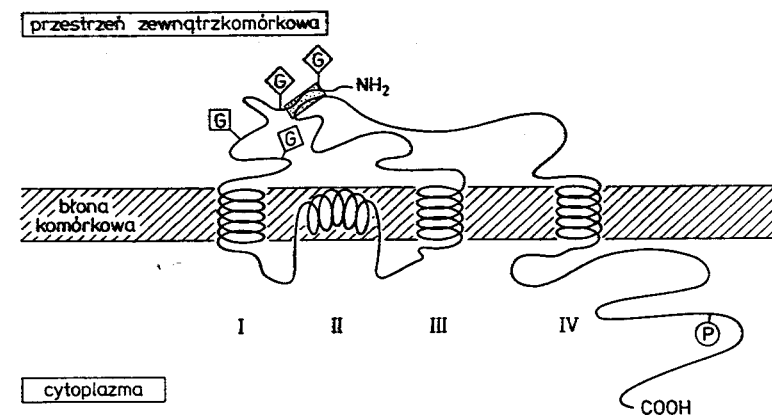
Biologia molekularna

Jak dotąd sklonowano dwie rodziny podjednostek receptora NMDA określane jako NMDAR1 i NMDAR2 (ryc. 9.1, tab. 9.2). Podjednostki receptora NMDA szczurów są bardzo zbliżone (homologiczne) do podjednostek występujących u ludzi, np. różni się tylko 8 z 885 reszt aminokwasowych dla NMDAR1, natomiast dla NMDAR2A 81 z 1464. Doświadczenia opisane poniżej dotyczą podjednostek scharakteryzowanych w mózgu szczurów.

Tabela 9.2. Charakterystyka podjednostek receptora NMDA

Podjednostka	Liczba aminokwasów	Rozmieszczenie w mózgu
NMDAR1	920	cały mózg (szczególnie CA1)
NMDAR2A	1445	cały mózg
NMDAR2B	1456	przodomózgowie
NMDAR2C	1218	mózdzek
NMDAR2D	1329	pień mózgu, rdzeń kręgowy

Typ NMDAR1 występuje w 8 izoformach różniących się: inkorporacją eksonu przy N-końcu, usuwaniem eksonu przy C-końcu i alternatywną inkorporacją eksonu przy C-końcu łańcucha białka receptorowego ($2 \times 2 \times 2 = 8$ wariantów) (ryc. 9.5). Inkorporacja eksonu przy N-końcu ma istotny wpływ na cechy farmakologiczne receptora NMDA, np.:



Ryc. 9.5. Topologiczny model podjednostki receptora NMDA obrazujący położenie miejsc: wiązania agonisty (zakropkowana strefa w końcu NH₂), fosorylacji (P) i glikozylacji (G) w relacji do hydrofobowych fragmentów przechodzących przez błonę komórkową (ang. *transmembrane domain*, TM)

1. Kompetycyjni (np. CPP) i bezkompetycyjni (np. MK-801, ketamina) antagoniści działają silniej na formę zawierającą ten ekson.

2. Zn²⁺ moduluje formę bez eksonu dwufazowo, tzn. stymuluje w małych stężeniach, a w większych hamuje. W przypadku udziału podjednostki NMDAR1 z eksonem występuje tylko faza stymulująca.

Typ NMDAR2 jest reprezentowany przez 4 odrębne podjednostki: NMDAR2 A, B, C i D. Receptory homomeryczne składające się wyłącznie z podjednostki NMDAR1 wykazują pewne cechy funkcjonalne, natomiast kompleks homomeryczny złożony tylko z podjednostek NMDAR2 nie tworzy czynnych kanałów jonowych. Stwierdzono, że heteromeryczne receptory (NMDAR1 + NMDAR2A–D) wykazują znacznie większą aktywność–przepuszczalność dla jonów w wyniku stymulacji agonistą (ok. 100 ×), niż receptory homomeryczne złożone tylko z NMDAR1.

Biorąc pod uwagę wrażliwość różnych wariantów receptora NMDA na glicynę, ifenprodyl i magnez wydaje się, że kompozycja podjednostek może mieć duże znaczenie funkcjonalne (tab. 9.3). Wszystkie rekombinowane receptory NMDA wykazują zależną od potencjału błonowego blokadę magnezową, ale ich wrażliwość na stężenie Mg²⁺ zmienia się w zależności od składu podjednostkowego. Receptory homomeryczne zbudowane z podjednostek NMDAR1 i heteromeryczne składające się z jednostki NMDAR1 połączonej z NMDAR2A lub NMDAR2B wykazują blokadę magnezową przy EC₅₀ równym 1–10 μM (dla potencjału błonowego –100 do –80 mV). Kombinacja podjednostki NMDAR1 z NMDAR2C daje receptor o małym powinowactwie do Mg²⁺ (EC₅₀ = 130 μM), który nawet w fizjologicznym stężeniu tych kationów nie jest w pełni zablokowany, nawet poniżej spoczynkowego potencjału błony komórkowej (–70 do –100 mV). Do tej pory nie wiadomo, jakie znaczenie funkcjonalne mają różnice we wrażliwości na magnez opisane dla różnych podjednostek. Intrygujący jest jednak fakt, że pod-

jednostki NMDAR2C ulegają ekspresji w momentach krytycznych ontogenezy w pewnych rejonach o.u.n.. Zmiana wrażliwości na magnez (w tym przypadku jej zmniejszenie) może mieć także potencjalne znaczenie w ekscytotoksyczności, np. w niedotlenieniu mózgu.

Tabela 9.3. Porównanie charakterystyki receptorów NMDA składających się z różnych podjednostek

Kompozycja NMDAR1+	Czas deaktywacji (ms)	Wrażliwość na Mg ²⁺	Wrażliwość na ifenprodyl	Wrażliwość na glicynę
NMDAR2A	118	+++	+	+
NMDAR2B	400	+++	+++	++
NMDAR2C	382	+	+	+++
NMDAR2D	>1000	+	+	+

Część białka podjednostki tworząca odcinek przechodzący przez błonę komórkową określana jest jako domena transbłonowa (ang. *transmembrane domain*, TM) i charakteryzuje się dużą lipofilnością (ryc. 9.5). TM II tworzy najprawdopodobniej ścianę kanału jonowego i zawiera aminokwas asparaginę w miejscu, w którym receptory AMPA/kainowe mają tzw. miejsce Q/R (alternatywne występowanie aminokwasu argininy lub glutaminy, ryc. 9.7 — miejsce 3). Obecność asparaginy determinuje przepuszczalność kanału NMDA dla jonów wapniowych i zależny od potencjału błonowego blok wywołany przez Mg²⁺. Badając wpływ mutacji na funkcję receptora NMDA stwierdzono, że obecność aminokwasu asparaginy w pozycji 481 podjednostki NMDAR1 jest krytyczna dla wiązania glicyny, natomiast wiązanie kwasu glutaminowego determinują dwa fragmenty, a mianowicie w rejonie N-końca oraz między TM III i TM IV.

Rozmieszczenie podjednostki receptora NMDAR1 uwidocznione techniką hybrydyzacji mRNA *in situ* koreluje z wynikami badań wiązania receptorowego (autoradiografia), zgodnie wykazując największą gęstość tej podjednostki w polu CA1 hipokampa (tab. 9.2). Podobne wyniki uzyskano stosując przeciwciała przeciwko białku NMDAR1. Zaskakująca jest obserwacja, że są w mózgu regiony, gdzie występuje podjednostka NMDAR1, a brak jest NMDAR2. Może to sugerować, że istnieją w tych strukturach mózgu nowe, jeszcze nie odkryte podjednostki, lub że dochodzi tam do ekspresji receptora homomerycznego.

W ontogenezie NMDAR2B wykazuje podobną ekspresję przez cały okres rozwoju, natomiast ekspresja NMDAR2A oraz NMDAR1 stopniowo wzrasta, co związane jest z nasileniem plastyczności synaptycznej.

Obecność tak wielu podjednostek ze wszystkimi wariantami stwarza teoretycznie możliwość istnienia olbrzymiej liczby podtypów receptora NMDA. Zakładając, że 5 podjednostek tworzy receptor, możliwość kompozycji (biorąc pod uwagę, że obecność NMDAR1 jest konieczna) przedstawia się następująco: $8 \times 12 \times 12 \times 12 \times 12 = 165\,888$ podtypów receptora. Nie wiadomo, czy w rze-

czywistości taka różnorodność występuje w naturze. Ostatnio stwierdzono jednak, że w skład receptora NMDA mogą wchodzić co najmniej 3 różne podjednostki.

Różnorodność receptorów NMDA wynikająca z kompozycji podjednostek może mieć nie tylko znaczenie fizjologiczne, lecz również patologiczne. Stwierdzono, że w niedokrwieniu dochodzi do wzrostu ekspresji NMDAR1, a z wiekiem zmienia się proporcja wariantów tej podjednostki powstałych w wyniku procesu alternatywnego wycinania i scalania.

Receptory AMPA

Charakterystyka farmakologiczna

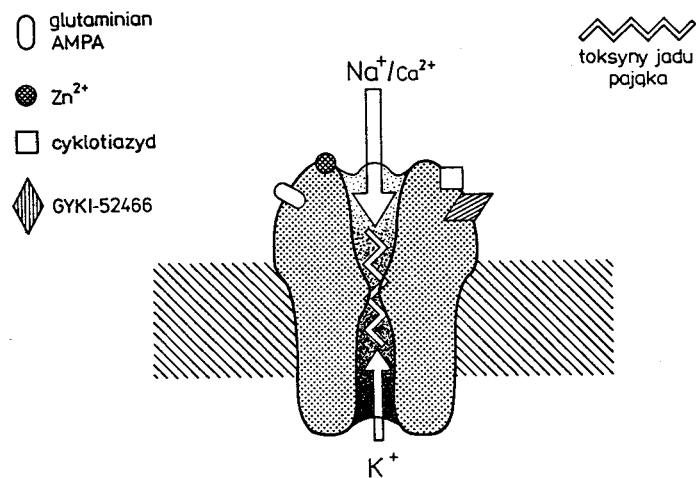
Charakterystyczną cechą receptora AMPA jest szybko (w czasie milisekund) pojawiająca się reakcja desensytyzacji na agonistę, którą można traktować jako mechanizm obronny przed nadmierną aktywacją.

Kompetycyjnymi antagonistami receptora AMPA są pochodne chinoksaliny, takie jak CNQX, NBQX oraz ostatnio wprowadzony PNQX (tab. 9.4). Poza miejscem głównego neuroprzekaznika, receptor AMPA ma również miejsca modulujące (tab. 9.4, ryc. 9.6). Jednym z nich jest miejsce 2,3-benzodiazepin, którego aktywacja hamuje desensytyzację receptora AMPA. Agonistą tego miejsca jest cyklotiazyd, którego działanie antagonizuje np. GYKI-52466. Kwas kainowy również aktywuje receptor AMPA, odpowiedź ta nie ulega jednak desensytyzacji. Dodatkowym źródłem modulacji receptora AMPA jest miejsce wiążące jony Zn²⁺. Jony cynkowe w małych stężeniach (30 μM) wzmagają aktywność receptora AMPA, natomiast w większych (mM) hamują go poprzez bezpośrednią blokadę kanału jonowego. Ponadto, filantotoksyna — jeden ze składników jadu pająków, także blokuje kanał receptora AMPA (ryc. 9.6).

Tabela 9.4. Miejsca modulujące receptora AMPA

Miejsce	Agoniści	Antagoniści	Znakowane ligandy
AMPA	AMPA, kwas kwiskwalinowy	CNQX, NBQX, PNQX, YM-90K	[³ H]AMPA; [³ H]NBQX
2,3-Benzodiazepin	cyklotiazyd, diazoksyd	GYKI-52466 GYKI-53655*	[³ H]GYKI-52466
Cynk — na zewnątrz kanału	cynk	?	?
Blokery kanału jonowego			Znakowane ligandy
Cynk, składniki jadu pająków			?

* Ostatnio opublikowane badania wskazują, że cyklotiazyd i GYKI wiążą się do różnych miejsc wykazujących jednak silną interakcję allosteryczną (tzn. nie jest to interakcja kompetycyjna).



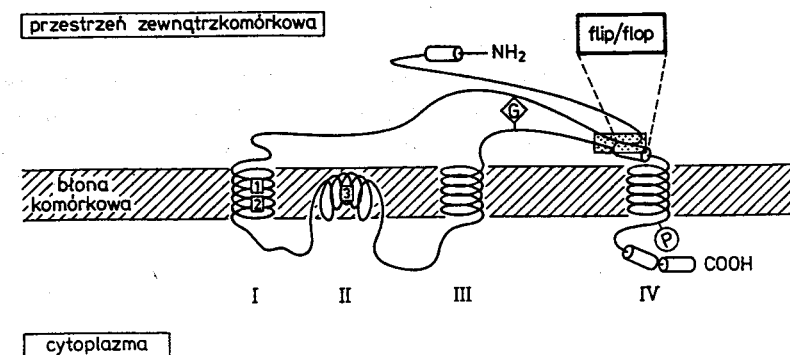
Ryc. 9.6. Schemat receptora AMPA uwzględniający miejsca modulujące (dalsze wyjaśnienia w tekście)

Rola fizjologiczna

Jak wspomniano wyżej, uważa się, że receptory AMPA mają podstawowe znaczenie w szybkim przekaźnictwie synaptycznym układu glutaminianergicznego (EPSP), i w związku z tym, w wielu procesach fizjologicznych. Według współczesnych poglądów receptory AMPA pełnią istotną rolę w indukcji LTP bezpośrednio (np. w CA3) lub poprzez depolaryzację usuwającą blokadę receptorów NMDA przez Mg^{2+} oraz w ekspresji tego zjawiska (albowiem wrażliwość tych receptorów zmienia się po indukcji LTP). Informacje o roli receptorów AMPA *in vivo* są jednak bardzo ograniczone ze względu na stosunkowo niedawne zsyntetyzowanie antagonistów tego receptora przechodzących przez barierę krew-mózg. Istniejące piśmiennictwo na ten temat zawiera bardzo dużo sprzecznych doniesień. Biorąc pod uwagę rolę receptorów AMPA w mediowaniu EPSP i ekspresji LTP, uderzający jest brak silnych skutków behawioralnych po podaniu antagonistów tego receptora, z wyjątkiem działania neuroprotekcynowego (porównaj: Modulacja receptorów glutaminianergicznycch jako strategia terapeutyczna).

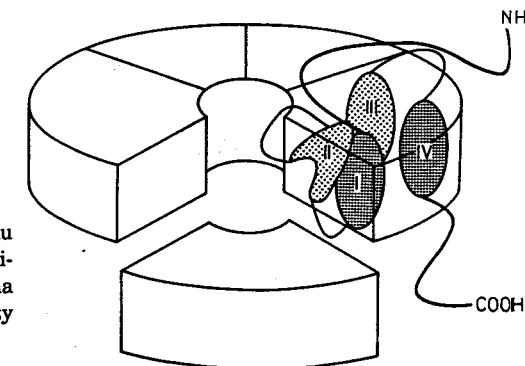
Biologia molekularna

Funkcjonalny kanał jonowy (receptor AMPA) może powstawać jako kompleks homomeryczny lub heteromeryczny kombinacji 2 lub więcej podjednostek: GluR1, GluR2, GluR3 lub GluR4 (lub a, b, c, d) (ryc. 9.1). Każda z wymienionych podjednostek występuje w formie dwóch wariantów (*flip* lub *flop*)



Ryc. 9.7. Topologiczny model podjednostki receptora AMPA obrazujący położenie miejsc: wiązania agonisty (obszar zakropkowany w końcu NH_2), fosforylacji (P) i glikozylacji (G) w relacji do hydrofobowych fragmentów przechodzących przez błonę komórkową (TM). Odcinki oznaczone jako walce ilustrują miejsca podlegające alternatywnej modyfikacji potranskrypcyjnej (ang. *alternative splicing*). Numerami 1, 2 i 3 oznaczono miejsca, w których dochodzi do zmiany pojedynczych aminokwasów w wyniku edycji mRNA (dalsze wyjaśnienia w tekście)

powstających w wyniku potranskrypcyjnej modyfikacji mRNA (*splicing*). Oznacza to w konsekwencji alternatywne występowanie określonej sekwencji 38 aminokwasów w podjednostkach receptora AMPA (ryc. 9.7). Modyfikacja ta ma istotne znaczenie funkcjonalne — forma *flip* wykazuje znacznie wolniejszą desensytyzację, tzn. w czasie aktywacji agonistą więcej jonów przechodzi przez kanał jonowy. W rozwoju ontogenetycznym forma *flip* obecna jest we wczesnym okresie prenatalnym, natomiast forma *flop* pojawia się dopiero po urodzeniu (15 dzień u szczurów). Następnie, często obie formy występują w tych samych neuronach, jednakże forma *flip* (dla GluR2) przeważa np. w regionie CA3 hipokampa, natomiast forma *flop* w regionie DG i CA1. Jeżeli w skład receptora AMPA wchodzi podjednostka GluR2, to wykazuje on znikomą przepuszczalność dla Ca^{2+} . Badania molekularne wykazały, że jest to związane z obecnością dodatnio naładowanej argininy w tzw. miejscu Q/R TM II tworzącej prawdopodobnie por kanału jonowego (ryc. 9.7 — miejsce oznaczone 3, ryc. 9.8). DNA kodujący tę podjednostkę



Ryc. 9.8. Organizacja przestrzenna układu 5 podjednostek tworzących kanał glutaminianergicznego receptora jonotropowego na przykładzie receptora AMPA. TM II tworzy prawdopodobnie ścianę kanału jonowego

zawiera informację odpowiadającą glutaminie, tak więc wstawianie argininy jest konsekwencją edycji mRNA (jest to pierwszy przykład edycji neuronalnego mRNA). Stwierdzono, że forma nie edytowana (wzrost przepuszczalności dla jonów wapniowych) może występować jedynie we wczesnej fazie rozwoju embrionalnego, lecz nigdy po urodzeniu. Pozostałe podjednostki (1, 3, 4) zamiast argininy mają glutaminę w miejscu Q/R i w związku z tym receptory AMPA nie zawierające podjednostki GluR2 są przepuszczalne dla jonów wapniowych. Podobnie jak w

Tabela 9.5. Charakterystyka podjednostek tworzących receptory AMPA i kainowe (siła działania agonistów dotyczy kompleksu homomerycznego)

Podjednostka	Liczba aminokwasów	Siła działania agonistów	Rozmieszczenie w mózgu
GluR1	889	Q>D>A>G>K	CTX (w niektórych warstwach); hipokamp (DG, CA1, CA3); CB (brak w komórkach ziarnistych)
GluR2	862	Q>A>G>K	CTX (we wszystkich warstwach); hipokamp (DG, CA1, CA3); CB (brak w gliocytach nabłonkowych)
GluR3	866	Q>A>G>K	CTX (w niektórych warstwach); hipokamp (DG, CA1, CA3); CB (brak w komórkach ziarnistych i gliocytach nabłonkowych)
GluR4	881	Q>A>G>K	CTX (w niektórych warstwach); hipokamp (CA1, DG)
GluR5	875	D>K>Q>G>A	CB (komórki gruszkowate), CTX (obróczy, gruszkowata), jądro migdałowe, boczna przegroda
GluR6	877	D>K>Q>G	hipokamp (CA3, DG); CB (komórki ziarniste)
GluR7	888	D>K>G>Q>A	CTX (kora nowa), hipokamp (DG)
KA1	936	K>Q>D>G>A	hipokamp (DG, CA3); CB (komórki gruszkowate)
KA2	965	K>Q>D>G>A	cały mózg

Q — kwas kwiskwalinowy; A — AMPA; G — kwas L-glutaminowy; K — kwas kainowy; D — kwas domowy (ang. *domoic acid*); CTX — kora mózgowa; CB — mózdzek; DG — zakręt zębaty.

przypadku receptora NMDA, teoretyczna możliwość kompozycji podjednostek AMPA jest ogromna: $8 \times 8 \times 8 \times 8 \times 8 = 32\,768$ podtypy (4 podtypy \times 2 warianty powstałe w wyniku procesu potranskrypcyjnej modyfikacji mRNA). Receptory AMPA zbudowane z różnych podjednostek wykazują nieco inną wrażliwość na agonistów (tab. 9.5).

Ostatnio opublikowano dane wskazujące na selektywne zmiany pewnych podjednostek/wariantów w sytuacjach patologicznych lub ich modelach doświad-

czalnych. W czasie „*kindlingu*” (elektrofizjologiczny model padaczki) obserwuje się wzrost ekspresji formy *flip* (*flop* bez zmian), co może prowadzić do zwiększenia wrażliwości receptorów AMPA. W tym samym modelu dochodzi też do spadku ekspresji podjednostki GluR2, co powoduje wzrost liczby receptorów AMPA przepuszczalnych dla jonów Ca^{2+} i w konsekwencji może prowadzić do uszkodzeń neuronów. Podobne zmiany stwierdzono w niedokrwieniu mózgu (wzrost ekspresji formy *flip*, spadek ekspresji podjednostki GluR2). Zmiany te mogą być bezpośrednio związane z późną fazą neurodegeneracji w niedokrwieniu mózgu.

Receptory kainowe

Charakterystyka farmakologiczna i rola fizjologiczna

Receptory kainowe charakteryzują się dużym powinowactwem do kwasu kainowego wykazanym w badaniach tzw. wiązania receptorowego (kwas kainowy > kwas L-glutaminowy > AMPA). Do niedawna wiedza na temat receptorów kainowych była niezwykle fragmentaryczna, a ich odróżnienie od receptorów AMPA prawie niemożliwe. Dopiero badania molekularne (sklonowanie odpowiednich genów) pozwoliły na uporządkowanie klasyfikacji (ryc. 9.1). Główną trudnością był (i w dużym stopniu ciągle jest) brak selektywnych agonistów lub antagonistów pozwalających na odróżnienie receptorów kainowych od receptorów AMPA. Dopiero ostatnio opublikowano dane sugerujące, że związek NS-377 jest selektywnym antagonistą receptorów kainowych typu GluR6 (patrz: Biologia molekularna), natomiast związek GYKI-53655 wykazuje ponad 100-krotnie słabsze działanie antagonistyczne na receptory kainowe niż na receptory AMPA.

Jak dotąd działania elektrofizjologiczne typowe dla receptora kainowego obserwowano jedynie w zwojach czuciowych, lecz nie w mózgu. Sugeruje się zatem, że receptory kainowe mogą być umiejscowione bądź presynaptycznie, bądź na dendrytach czy synapsach, utrudniając elektrofizjologiczną rejestrację ich aktywacji za pomocą metody elektrofizjologicznej *patch clamp*. W neuronach czuciowych rdzenia (ang. *dorsal root ganglion* — włókna C) umiejscowione są klasyczne receptory kainowe, tzn. receptory pobudzane przez kwas kainowy, lecz nie przez AMPA lub kwas kwiskwalinowy. Ostatnio zaobserwowano przejściową ekspresję funkcjonalnych receptorów kainowych niewrażliwych na AMPA w młodych hodowlach komórek hipokampa (badania elektrofizjologiczne).

Cyklotiazyd hamuje desensytyzację receptorów kainowych (patrz dalej) stymulowanych kwasem kainowym, natomiast nie ma wpływu na podlegające słabej desensytyzacji działanie AMPA. Działanie cynku na receptory kainowe jest podobne jak na receptory AMPA.

Obecność receptorów kainowych (wiązanie [3H]kainianu) wykazano przede wszystkim w rejonie CA3 hipokampa, korze mózgowej i bocznej przegrodzie.

Biologia molekularna

Charakterystyka funkcjonalna ostatnio sklonowanych receptorów kainowych (GluR5, 6, 7 oraz KA1 i KA2; ryc. 9.1, tab. 9.5) jest bardzo słabo poznana. Wiadomo, że [³H]kainian wiąże się do KA1 i KA2 z dużym powinowactwem (wartości $K_D < \text{nM}$), natomiast do GluR5–7 z nieco mniejszym ($K_D = 50\text{--}70 \text{ nM}$), co odpowiada dwóm miejscom wiązania obserwowanym w badaniach na homogenatach mózgu szczurów. Kwas kainowy działając na GluR5, 6 lub 7 wywołuje aktywację charakteryzującą się szybką desensytyzacją (zanik reakcji na agonistę).

Podjednostki KA1 i KA2 nie tworzą funkcjonalnych kanałów homomerycznych, lecz jedynie w kombinacji z GluR5–7. Podjednostki GluR5–6 (lecz nie GluR7) w układzie budowy homomerycznej mogą tworzyć funkcjonalne kanały. Kompozycja podjednostek ma istotny wpływ na funkcjonalną i farmakologiczną charakterystykę receptorów kainowych. Wykazano ostatnio, że AMPA aktywuje receptor zbudowany z podjednostek GluR6/KA2, ale nie homomeryczny receptor GluR6 (tab. 9.5). Ponadto kombinacja GluR5/KA2 wykazuje szybszą desensytyzację i odmienną rektyfikację (zależność charakterystyki przewodności jonów od potencjału błony komórkowej) niż homomeryczny receptor zbudowany tylko z GluR5.

Podjednostki receptorów kainowych występują przede wszystkim w korze nowej, korze obręczy, jądrze ogoniastym, rejonie CA3 hipokampa, wzgórzu, podwzgórzu (wyniosłość pośrodkowa) i w warstwie komórek ziarnistych mózgdzku.

Receptory metabotropowe

Badania prowadzone w połowie lat 80. wykazały, że kwas glutaminowy pełni bardziej kompleksową funkcję niż tylko pobudzające działanie poprzez receptory jonotropowe. Dodanie glutaminianu do hodowli komórkowych zawierających komórki nerwowe prądkowia, hipokampa i mózgdzku lub gwiaździste komórki glejowe powodowało aktywację fosfolipazy C (PLC) i związane z tym wytwarzanie wtórnego przekaźnika informacji — IP₃. Ponieważ działanie to blokowała toksyna krztusca (PTX), stało się jasne, że są to receptory związane z białkami G.

Badania ostatnich lat wykorzystujące techniki biologii molekularnej ujawniły istnienie przynajmniej 8 podtypów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych (mGlu). Z uwagi na brak specyficznych agonistów dla poszczególnych podtypów receptorów metabotropowych aktywowanych przez kwas glutaminowy, oznacza się je kolejnymi cyframi arabskimi (odpowiednio mGlu₁, mGlu₂, mGlu₃ itd.). Cyfry te oznaczają chronologiczną kolejność, w jakiej klonowano poszczególne białka receptorowe, dlatego też w żaden sposób nie odzwierciedlają stopnia homologii między nimi. Na podstawie wzajemnego podobieństwa sekwencji ami-

nokwasowych oraz podobnego profilu farmakologicznego wspomniane receptory mogą być podzielone na trzy podgrupy:

I. mGlu₁ (możliwość istnienia 3 wariantów wynikających z różnej modyfikacji potranskrypcyjnej mRNA) i mGlu₅. Receptory te aktywują PLC, która katalizując reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu prowadzi do powstania dwóch wtórnych przekaźników informacji — IP₃ i DAG. IP₃ działając na swoisty (wewnątrzkomórkowy) receptor powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺ w wyniku uwolnienia tych jonów z siateczki śródplazmatycznej, natomiast DAG aktywuje kinazę białkową typu C (PKC);

II. mGlu₂ i mGlu₃ — hamujące aktywność cykazy adenylanowej (AC) i zmniejszające tym samym wewnątrzkomórkowy poziom cAMP;

III. mGlu₄, mGlu₆, mGlu₇ i mGlu₈ — również ujemnie związane z cyklazą adenylanową, mające jednak odmienne niż mGlu₂ i mGlu₃ preferencje w stosunku do agonistów.

Charakterystyka farmakologiczna i rola fizjologiczna

Kwas glutaminowy jest endogennym agonistą wszystkich 8 wymienionych podtypów receptorów. Pierwszą z substancji mających większą selektywność w stosunku do poszczególnych podtypów tych receptorów był kwas kwiskwalinowy wykazujący duże powinowactwo do metabotropowych receptorów glutaminianergicznych związanych z PLC. Nie jest to jednak związek farmakologicznie „czysty”, ponieważ jest on również bardzo silnym agonistą receptora AMPA. Istotny postęp w tej dziedzinie dokonał się wraz z wprowadzeniem cyklicznych analogów kwasu glutaminowego. Pierwszym związkiem z tej grupy był 1S,3R-ACPD. Ma on dużą specyficzność dla metabotropowych receptorów glutaminianergicznych przy relatywnie małym powinowactwie do receptorów jonotropowych. Związek ten działa agonistycznie na większość receptorów metabotropowych, nie wykazując żadnych preferencji do któregośkolwiek z podtypów. Pomimo to zdobył jednak pozycję klasycznego „narzędzia” używanego w badaniach funkcji metabotropowych receptorów glutaminianergicznych.

Do innych substancji o względnej selektywności wobec receptorów metabotropowych należą: L-AP4, L-CCG-I, DHPG. Związki takie jak DCG-IV, wspomniany wcześniej kwas kwiskwalinowy i kwas ibotenowy mają wprawdzie silne właściwości agonistyczne w stosunku do receptorów mGlu, są jednak również agonistami glutaminianergicznych receptorów jonotropowych. Wymienione substancje mogą być zatem bardziej przydatne do charakterystyki podgrup receptorów metabotropowych niż konkretnych podtypów w obrębie grup (tab. 9.6). Pewną wskazówką przybliżającą znaczenie poszczególnych podtypów w mediuwaniu danych skutków fizjologicznych jest porównanie wartości EC₅₀ (stężenie substancji, w którym wykazuje ona 50% maksymalnego działania, np. stymulacja tworzenia IP₃). Wartość tę wyznacza się dla wielu substancji aktywujących

konkretny receptor indukowany metodą transfekcji w komórkach embrjonalnych i porównuje się z wartościami EC₅₀ znajdującymi w różnych układach doświadczalnych w materiale biologicznym zawierającym receptory natywne (ang. *wild receptors*).

Tabela 9.6. Charakterystyka glutaminianergicznych receptorów metabotropowych

Grupa	Pod-jednostka	Liczba aminokwasów	Układ wtórnego przekaźnika informacji	Agonista	Rozmieszczenie w mózgu
I	mGlu _{1α}	1199	IP ₃ , DAG (+)	Q>I>G> L-CCG-I>>AC	hipokamp (CA2, CA3); CB (komórki gruszkowate), opuszki węchowe
	mGlu _{1β}	906	AA		
	mGlu _{1c}	897	cAMP (+)		
I	mGlu ₅	1151	IP ₃ , DAG (+)	Q>G=I> L-CCG-I>>AC	CTX, hipokamp (CA1, CA2, CA3); CB (komórki ziarniste); opuszki węchowe
II	mGlu ₂	854	cAMP (-)	DCG-IV> L-CCG-I> G>AC>I>Q	CB (komórki Golgiego)
	mGlu ₃	857	cAMP (-)	DCG-IV> L-CCG-I> G>AC>I>Q	neurony i glej
III	mGlu ₄	880	cAMP (-)	L-AP4>G>AC (Q=0)	CB (komórki ziarniste)
	mGlu ₇	brak danych	cAMP (-)	L-AP4>G	zakręt zębaty, opuszki węchowe, kora śródwęchowa, zwoje czuciowe grzbietowe rdzenia kręgowego
	mGlu ₈	brak danych	cAMP (-)	brak danych	brak danych
	mGlu ₆	871	cAMP (-)	L-AP4>G>Q	siatkówka

Q — kwas kwiskwalinowy; I — kwas ibotenowy; AC — 1S,3R-ACPD; G — kwas glutaminowy; CB — mózdzek; CTX — kora mózgowa, AA — kwas arachidonowy, (+) — wzrost, (-) — spadek.

Do pierwszych opisanych antagonistów receptorów związanych z PLC (mGlu₂ i mGlu₅) należą L-AP4 i blisko chemicznie z nim spokrewniony kwas L-AP3. Trzeba jednak dodać, że substancje te nie antagonizowały w pełni wielu skutków elektrofizjologicznych wywoływanych przez 1S,3R-ACPD. Może to wynikać z faktu, że substancje te wykazywały właściwości częściowych agonistów, gdy badano ich wpływ na hydrolizę błonowych fosfolipidów inozytolowych. Trzeba także pamiętać, że L-AP4 jest całkowitym agonistą receptorów mGlu związanych z cyklazą adenylanową (tab. 9.6). Nową grupą antagonistów są związki będące pochodnymi fenyloglicyny. Należą do nich S-3HPG, S-4CPG, S-4C3HPG i MCPG.

Związki te selektywnie antagonizowały depolaryzację wywołaną podaniem 1S,3R-ACPD w motoneuronach szczurzych noworodków. Profil działania S-3HPG i S-4C3HPG sugerował częściowo agonistyczne właściwości, natomiast S-4CPG i, w szczególności, MCPG wykazywały działanie w pełni antagonistyczne.

Metabotropowy receptor glutaminianergiczny wydaje się modulować szybkość transmisji synaptyczną związaną z kanałami jonowymi. Aktywacja danego układu wtórnych przekaźników informacji może mieć skutki pobudzające lub hamujące w zależności od tego, jaki typ kinaz białkowych jest aktywowany.

W komórkach ziarnistych mózdzku 1S,3R-ACPD zwiększa aktywność zależnych od jonów wapniowych kanałów K⁺ o dużej przewodności, zmniejszając pobudliwość tych neuronów. W przeciwieństwie do tego, aktywacja receptorów mGlu przez 1S,3R-ACPD w komórkach piramidowych hipokampa wywołuje ich depolaryzację, zwiększając tym samym pobudliwość. Dokonuje się to przez zahamowanie zależnych od potencjału kanałów K⁺. Stwierdzono też, że receptory mGlu modulują zależne od napięcia kanały Ca²⁺ typu L.

Aktywacja receptorów mGlu może także prowadzić do wzrostu aktywności fosfolipazy A₂ (PLA2) i fosfolipazy D (PLD), wzmożonego wytwarzania cAMP i aktywacji fosfodiesterazy specyficznej dla cGMP (cGMP-PDE). Pobudzenie metabotropowych receptorów glutaminianergicznych może też modyfikować funkcje kanałów jonowych zależnych od potencjału oraz jonotropowe receptory glutaminianergiczne.

Jakkolwiek wpływy receptorów mGlu na kanały jonowe są różne w różnych rejonach mózgu oraz zależą od typu komórek, fizjologiczny skutek działania agonistów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych jest podobny. 1S,3R-ACPD redukuje wywołane postsynaptyczne potencjały pobudzające (EPSPs) na synapsach glutaminianergicznych w hipokampie, jądrze migdałowatym, prążkowie, mózdzku, jądrze pasma samotnego i w pierwotnych hodowlach komórek mitralnych opuszek węchowych. Najprawdopodobniej hamowanie to wynika z pobudzenia autoreceptorów, które powodują zmniejszenie wyrzutu glutamianu.

1S,3R-ACPD hamuje także postsynaptyczne potencjały hamujące (ang. *inhibitory post-synaptic potentials*, IPSP) w prążkowie, jądrze pasma samotnego i hipokampie. Przypuszcza się, że przynajmniej w hipokampie działanie to częściowo wynika ze zmniejszenia pobudliwości synaptycznej w interneuronach GABAergicznych. Analiza profilu farmakologicznego tego działania sugeruje, że jest ono mediowane przez inną grupę receptorów niż te, które wpływają na EPSP.

Metabotropowe receptory glutaminianergiczne pełnią istotną rolę w trakcie rozwoju ontogenetycznego o.u.n. oraz uczestniczą w procesach plastyczności synaptycznej (uczenie się, pamięć, tolerancja).

Fakt, iż niektóre działania obserwuje się tylko u młodych zwierząt i to w ściśle ograniczonych „oknach czasowych”, sugeruje duże znaczenie receptorów mGlu w procesach związanych z rozwojem o.u.n.. Wielokrotna stymulacja 1S,3R-ACPD indukuje w niedojrzałych neuronach okresowy prąd dokomórkowy, który utrzymuje się przez kilka godzin po usunięciu agonisty. Nie obserwuje się tego w

komórkach dojrzałych. Wpływ metabotropowych receptorów glutaminianergicznych na uwalnianie glutaminianu jest też różny w zależności od wieku. U szczurów 1–3-tygodniowych aktywacja receptora metabotropowego prowadzi do hamowania uwalniania kwasu glutaminowego, natomiast u zwierząt 3–5-tygodniowych oraz dojrzałych (2–5 miesięcy) obserwuje się działanie przeciwne.

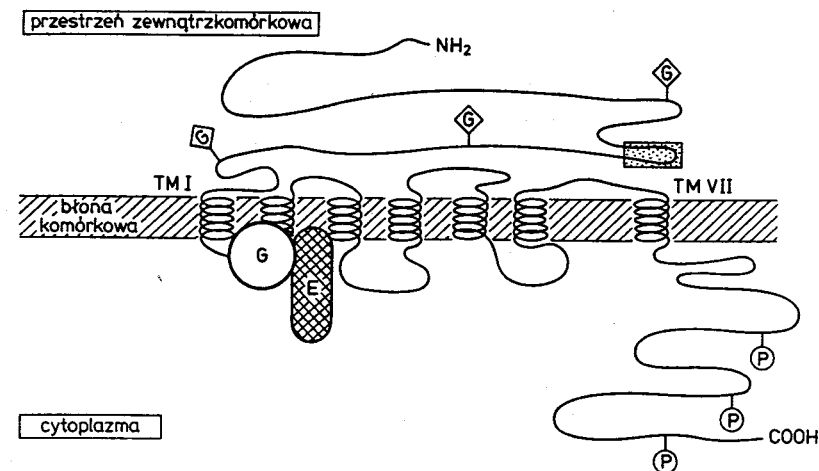
Indukcja LTP w rejonie CA1 hipokampa wymaga oprócz dostatecznego pobudzenia receptorów NMDA równoczesnej aktywacji receptorów mGlu. Obserwacja ta jest zgodna z danymi uzyskanymi w doświadczeniach behawioralnych analizujących procesy uczenia się i pamięci, w których wykazano prokognitywne działanie 1S,3R-ACPD. Metabotropowe receptory glutaminianergiczne zaangażowane są również w mechanizm odpowiedzialny za wywołanie LTD w korze wzrokowej i w mózdzku.

Przypuszcza się, że metabotropowe receptory glutaminianergiczne działając poprzez układ pozapiramidowy uczestniczą w kontroli aktywności motorycznej. Jednostronne podanie 1S,3R-ACPD do prążkowieca powoduje kontralateralne rotacje. Spowodowane jest to prawdopodobnie zwiększonym wydzielaniem dopaminy i może być blokowane przez antagonistę receptorów dopaminowych — haloperidol.

Metabotropowe receptory glutaminianergiczne mogą też mieć duże znaczenie w patologii o.u.n.. Wstrzyknięcie 1S,3R-ACPD do hipokampa wywołuje drgawki limbiczne, czemu towarzyszy śmierć komórek ziarnistych zakrętu zębatego i komórek piramidowych rejonu CA1. Skutek ten blokują antagoniści receptora NMDA, co wskazuje na to, że jest on związany z nadmierną aktywacją tego receptora jonotropowego przez pozytywne modulujące działanie receptorów mGlu. Z drugiej strony opisano wiele przykładów, gdzie 1S,3R-ACPD działa neuroprotekcynie w obecności toksycznych stężeń kwasu glutaminowego lub NMDA, co można prawdopodobnie wytłumaczyć działaniem na inne podtypy metabotropowych receptorów glutaminianergicznych.

Biologia molekularna

Białka receptorów mGlu są znacznie większe niż dotychczas opisane receptory związane z białkami G (np. receptory adrenergiczne, dopaminowe czy muskarynowe receptory cholinergiczne) i nie dzielą też z nimi homologii w zakresie sekwencji aminokwasowej. Jest to więc zupełnie odmienna, nowa rodzina receptorów działających poprzez białka G. Jak wspomniano wyżej, receptory te podzielono na trzy grupy (I, II i III). Wzajemne podobieństwo analizowane na podstawie identyczności aminokwasów wynosi w ramach poszczególnych podgrup około 70%, natomiast między grupami zmniejsza się do 45%. Siedem blisko siebie ułożonych segmentów o silnych właściwościach hydrofobowych wydaje się tworzyć odcinki penetrujące błonę komórkową (domeny transbłonowe, TM) (ryc. 9.9). C-końcowy fragment białka, prawdopodobnie umiejscowiony wewnątrzkomórkowo, wykazuje różną długość i niewielką homologię pomiędzy receptorami. Najbardziej zachowane (konserwowane) fragmenty to dodatkowy hydrofobowy



Ryc. 9.9. Topologiczny model podjednostki receptora metabotropowego obrazujący położenie miejsc: wiązania agonisty (obszar zakropkowany), fosforylacji (P), glikozylacji (G — w rąbie) w odniesieniu do hydrofobowych fragmentów przechodzących przez błonę komórkową (TM). Wewnątrzkomórkowa pętla między TM I i TM II odpowiada za interakcję z białkiem G, przez które stymulowany jest system efektorowy E (cyklaza adenylanowa lub fosfolipaza C)

odcinek, będący częścią zewnątrzkomórkowego odcinka N-końcowego, który przypuszczalnie jest miejscem wiązania liganda, oraz pierwsza i trzecia pętla wewnątrzkomórkowa, które prawdopodobnie biorą udział w wiązaniu sprzężonych z receptorem białek G. Duży konserwatyzm w obrębie receptorów mGlu (szczególnie TM VI) wykazują też odcinki budujące 7 domen transbłonowych.

Modulacja receptorów glutaminianergicznych jako strategia terapeutyczna

Potencjalne zastosowania terapeutyczne antagonistów receptorów NMDA są bardzo szerokie i można je podzielić na następujące grupy:

Działanie symptomatologiczne:

Padaczka, choroba Parkinsona, depresja, działanie anksjolityczne, bóle chroniczne (również fantomowe), uzależnienia lekowe (opioidy, kokaina), uzależnienia od alkoholu.

Działanie neuroprotekcyjne:

Stany ostre:
Niedokrwienie, niedotlenienie, hipoglikemia, urazy.

Stany przewlekłe:

Choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera, zespół Downa, choroba Huntingtona; amyloτροφiczne stwardnienie boczne, późne dyskinezy wywołane długotrwałym podawaniem leków neuroleptycznych, neuroprotekcja w zakażeniu HIV (AIDS).

Powstaje oczywiście pytanie, czy jest możliwe antagonizowanie receptorów tak wszechobecnych, jak np. NMDA, związanych z wieloma procesami fizjologicznymi bez ryzyka równoczesnego powstania poważnych skutków niepożądanych. Odpowiedź na to pytanie jest częściowo znana, ponieważ wiele z substancji używanych klinicznie przez wiele lat ma działanie antagonistyczne na receptory NMDA w zakresie stężeń terapeutycznych. Przykładem mogą tu być bezkompetycyjni antagoniści NMDA: memantyna (spastyczność, demencja); budypina (choroba Parkinsona), orfenadryna (choroba Parkinsona), ibogaina (uzależnienie opioidowe), flupirtyna (działanie przeciwbólowe), deksstrometorfan (działanie przeciwkaszlowe), amantadyna (choroba Parkinsona), akamprosyt (uzależnienie alkoholowe). Stosowanie akamprosytu wynika z obserwacji, że alkohol hamuje receptory NMDA w stężeniu, które występuje w mózgu w zatruciu alkoholowym. Do leczenia padaczki wprowadzono ostatnio inhibitor uwalniania kwasu glutaminowego — lamotryginę.

Ponadto, biorąc pod uwagę mnogość podtypów receptora NMDA jest bardzo prawdopodobne, że selektywne działanie na jeden podtyp związany z daną patologią może być najlepszym rozwiązaniem terapeutycznym pozwalającym na minimalizację działań niepożądanych.

Obecnie obserwuje się duże zainteresowanie zastosowaniem klinicznym dwu grup substancji: antagonistów miejsc GLY-B oraz blokerów kanału jonowego receptora NMDA. Uzasadnienie tego zainteresowania przedstawiono skrótowo poniżej.

- Glicyna jest endogennym koagonistą receptora NMDA, a więc wystarczająco duże stężenia antagonisty GLY-B powinny blokować funkcję tego receptora. Jak wykazują badania z zastosowaniem mikrodializy mózgu, stężenie glicyny w mózgu w niedokrwieniu ulega znacznie mniejszym fluktuacjom niż kwasu glutaminowego. W związku z tym do zahamowania funkcji receptora NMDA wystarczające jest relatywnie mniejsze stężenie antagonisty GLY-B, niż kompetycyjnego antagonisty NMDA. W badaniach elektrofizjologicznych stwierdzono, że w pewnym zakresie stężeń antagoniści GLY-B nasilają desensytyzację (hamują *plateau*) receptora NMDA przy niewielkim wpływie na fazę początkową (*peak*). Biorąc pod uwagę, że EPSP (transmisja synaptyczna) zachodzi w zakresie czasowym „*peak*”, natomiast ekscytotoksyczność w zakresie „*plateau*”, mechanizm taki wydaje się najkorzystniejszy dla działania neuroprotekcijnego, przy minimalnych skutkach niepożądanych.
- Początkowe próby kliniczne z bezkompetycyjnymi antagonistami NMDA (np. PCP) nie były zachęcające, tzn. obserwowano skutki niepożądane, takie

jak działanie psychozomimetyczne, pobudzenie i halucynacje. Niekorzystne objawy obserwowano również w próbach klinicznych z (+)-MK-801 u pacjentów z padaczką. W związku z tym zaczął dominować pogląd, iż substancje tego typu nie znajdują zastosowania terapeutycznego — chociaż cecha *use dependence* ich działania, tzn. silniejsza blokada przy bardziej zaznaczonej aktywacji receptora, czyni je teoretycznie atrakcyjnymi inhibitorami procesów ekscytotoksyczności. Ostatnio zwrócono jednak uwagę na fakt, że wiele tego typu substancji (memantyna, budypina, amantadyna, deksstrometorfan) jest już stosowanych klinicznie, z niewielkimi skutkami ubocznymi. Okazało się, że cechą wspólną tych leków jest znacznie słabsze ich powinowactwo do miejsca PCP oraz odwrotna zależność blokady kanału NMDA od potencjału błony komórkowej. Pierwsza cecha decyduje o szybkim odblokowaniu kanału NMDA (MK-801, związek o dużym powinowactwie potrzebuje kilku minut, aby go opuścić). Biorąc pod uwagę krótki czas otwierania pojedynczego kanału, określa się go nawet jako „funkcjonalnie nieodwracalnego antagonistę”. Druga cecha — odwrotna zależność stopnia blokady od potencjału — oznacza, iż przy normalnej transmisji (EPSP — krótkotrwała silna depolaryzacja) blokada będzie minimalizowana, natomiast przy patologicznej aktywacji (długotrwała umiarkowana depolaryzacja) będzie relatywnie stabilna.

Zastosowanie antagonistów AMPA nie będzie najprawdopodobniej tak powszechne jak antagonistów NMDA. Obecnie uważa się, że substancje te mogą być wykorzystane jako czynniki neuroprotekcyjne w padaczce, niedokrwieniu (np. przy zatrzymaniu akcji serca) oraz uszkodzeniach urazowych mózgu czy rdzenia kręgowego. W Japonii trwają obecnie w tym kierunku próby kliniczne ze związkiem YM-90K. Sugerowano również, że pozytywna modulacja receptorów AMPA (hamowanie desensytyzacji) może mieć działanie prokognitywne (nasilenie uczenia), jednak należy się też liczyć z niebezpieczeństwem nasilania procesów degeneracyjnych. Trwające obecnie próby kliniczne z tzw. AMPAkinami (o podobnym działaniu) powinny zweryfikować ich przydatność terapeutyczną.

Najmniej zaawansowane są badania nad terapeutycznym zastosowaniem modulatorów receptorów metabotropowych. Fakt, iż antagoniści receptorów mGlu osłabiają objawy abstynencji opioidowej, sugeruje możliwość ich zastosowania w uzależnieniu od opioidów. Ponadto, niektórzy agoniści receptorów mGlu wykazują u zwierząt działanie przypominające wpływy agonistów receptorów dopaminowych — a więc niewykluczone jest ich potencjalne zastosowanie w leczeniu choroby Parkinsona.

Literatura uzupełniająca

- Collingridge G.L., Singer W. (1990): Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 290–296.
- Danysz W., Parsons C.G., Bresink I., Quack G. (1995): Glutamate in CNS disorders — A revived target for drug development. *Drugs News and Perspectives* 8: 261–277.

- Danysz W., Zajaczkowski W., Parsons C.G. (1995): Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav. Pharmacol.* 6: 455–476.
- Frankiewicz T., Potier B., Bashir Z.I., Collingridge G.L., Parsons C.G. (1996): Effects of memantine and MK-801 on NMDA-induced currents in cultured neurones and on synaptic transmission and LTP in area CA1 of the rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.* 117: 689–697.
- Henley J.M. (1994): Kainate-binding proteins: phylogeny, structures and possible functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 182–190.
- Hollmann M., Heinemann S. (1994): Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 31–108.
- Jorgensen M., Tygesen C.K., Andersen P.H. (1995): Ionotropic glutamate receptors focus on non-NMDA receptors. *Pharmacol. Toxicol.* 76: 312–319.
- Lipton S. A. (1993): Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists — open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci.* 16: 527–532.
- Meldrum B., Garthwaite J. (1990): Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 379–387.
- Pin J.P., Duvoisin R. (1995): The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.* 34: 1–26.
- Schoepp D.D., Conn P.J. (1993): Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 13–20.
- Seeburg P.H. (1993): The TINS/TIPS lecture — the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16: 359–365.
- Watkins J., Collingridge G. (1994): Phenylglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 333–342.

Wykaz specjalistycznych skrótów

- (+)-MK-801 maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepteno-5,10-iminy
- (+,R)-HA-966 3-amino-1-hydroksy-2-pirolidon
- 1S,3R-ACPD kwas 1S,3R-1-aminocyklopentano-1,3-dikarboksylowy
- ACBC kwas aminocyklobutanokarboksylowy
- ACEA 1021 6,7-dichloro-5-nitro-1,4-dihydrochinoksalino-2,3-dion
- ACPC kwas aminocyklopropanokarboksylowy
- AMPA kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
- AP5 kwas 2-amino-5-fosfonowalerianowy
- AP7 kwas 2-amino-7-fosonoheptanowy
- ARG 636 toksyna jadu pająka
- CGP-37849 kwas DL-(E)-2-amino-4-metylo-5-fosfono-3-walerianowy
- CGP-39653 kwas DL-(e)-2-amino-4-propylo-5-fosfono-3-pentenowy
- CGS-19755 kwas *cis*-fosfonometylo-2-piperydynokarboksylowy
- Cl-KYN kwas 7-chlorokinureninowy
- CNQX 6-cyjano-7-nitrochinoksalino-2,3-dion
- CPP kwas 3-(2-karboksypiperazyno-4-ilo)propylo-1-fosfonowy
- 5,7-DCKA kwas 5,7-dichlorokinureninowy
- DCG-IV 2(S),1'(R),2'(R),3'(R)-2-(2',3'-dikarboksycyklopropylo)glicyna
- DHPG 3,5-dihydroksyfenyloglicyna
- DTNB kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)
- DTT 1,4-ditiotertiol
- GLY-B miejsca glicynowe związane z receptorami NMDA
- GYKI-52466 1-(4-aminofenylo)-4-metylo-7,8-metylenodioksy-5H-2,3-benzodiazepina
- GYKI-53655 1-(4-aminofenylo)-3-acetylo-4-metylo-3,4-dihydro-7,8-metylenodioksy-5H-2,3-benzodiazepina
- L-687,414 3R-(+)-*cis*-4-metylo-HA966
- L-689,560 (+/-)-4-(*trans*)-2-karboksy-5,7-dichloro-4-fenyloaminokarbonyloamino-1,2,3,4-tetrahydrochinolina
- L-701,324 7-chloro-4-hydroksy-3-(3-fenoksy)fenylo-2H-chinolina

- L-AP3 kwas L-2-amino-3-fosfonopropionowy
- L-AP4 kwas L-2-amino-4-fosfonomasłowy
- L-CCG-I 2(S),1'(S),2'(S)-2-(2'-karboksycyklopropylo)glicyna
- LY-274614 kompetycyjny antagonist receptorów NMDA
- MCPG (\pm)- lub (+)- α -metylo-4-karboksyfenyloglicyna
- MDL-105,519 kwas (E)-3-(2-fenylo-2-karboksyetylo)-3,6-dichloro-1H-indolo-2-karboksylowy
- memantyna 3,5-dimetylo-aminoadamantyna
- MNQX 5,7-dinitrochinoksalino-2,3-dion
- NBQX nitro-7-sulfanylobenzochinoksalino-2,3-dion
- NMDA kwas N-metylo-D-asparaginowy
- NS-377 antagonist receptorów AMPA
- PCP fencyklidyna
- PNQX antagonist receptorów AMPA
- S-3HPG (S)-3-hydroksyfenyloglicyna
- S-4C3HPG (S)-4-karboksy-3-hydroksyfenyloglicyna
- S-4CPG (S)-4-karboksy-3-hydroksyfenyloglicyna
- TCP tienylocykloheksylopiperydyna
- YM-90K 6-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-1H,4H-chinoksalino-2,3-dion