

Přednáška 4: Neuropřenašeče: katecholaminy (dopamin, adrenalin, noradrenalin)

V lidském mozku využívá katecholamin jako neurotransmitery cca 500 000 neuronů, což z celkového počtu zhruba 100 miliard představuje pouhých 0,0005%. A přitom ve výzkumu katechomaniergního přenosu věnováno daleko více prostoru než studiu jiných přenašečových systémů. Proč normální funkce mozku závisí na aktivitě takto malého počtu neuronů?

V dnešní přednášce se budeme zabývat zástupci tzv. skupiny biogenních monoaminů – neuropřenašečů, pro které je typická přítomnost jedné aminoskupiny v molekule: **noradrenalinem**, **dopaminem** a jen nesmírně okrajově **adrenalinem**. (Serotonin a histamin nás čekají v příští přednášce.) Monoaminové neurotransmitery modulačně ovlivňují v podstatě každý neuronální okruh CNS, stimulačně či inhibičně regulují komunikaci mezi neurony a plasticitu těchto neuronálních okruhů. Neuronální okruhy zapojené do vyšších mozkových funkcí jako jsou volní pohyby, emoce či kognitivní procesy jsou zpracovávány cestou rychlého excitačního přenosu na dobře definovaných synapsích. Tento způsob informačního toku do určité míry překrývají modulační systémy, které kromě monoaminů zahrnují i acetylcholin, neuropeptidy či puriny. Narozdíl od neuropřenašečů spojených s přímým zpracováním jednotlivých bitů informací o externím prostředí, modulační působení monoaminů se realizuje cestou receptorů spřažených s G-proteiny.

Noradrenalin (NA), dopamin i adrenalin (A) jsou v CNS produkovány velmi omezeným počtem neuronů sdružených do specifických jader. Pro jejich lokalizaci a pro neuroanatomické dráhy jednotlivých neuropřenašečových systémů odkazují na druhou přednášku, nyní jen krátce:

- Noradrenergní neurony se nacházejí zejména v locus coeruleus na spodině čtvrté mozkové komory v rostrální části Varolova mostu. Locus coeruleus obsahuje na každé straně mozkového kmene u člověka jen cca 12 500 noradrenergních neuronů (více než 50% všech noradrenergních neuronů CNS), které difúzně se projikují do mozkové kůry, mozečku a míchy. Tyto projekce jsou součástí vzestupného retikulárního aktivačního systému. Norepinefrin v CNS zprostředkuje funkce ovlivňující náladu, spánek, kognitivní procesy nebo procesy vyžadující pozornost. V periferním nervovém systému je norepinefrin mediátorem postgangliových neuronů sympatiku a jako hormon je uvolňován z jater, mesenterálních orgánů a nadledvin
- Adrenalin je produkován především v dřeni nadledvin. V savčím mozku dosahuje cca 4-22% množství noradrenalinu a jeho výskyt je spojován především s hypothalamem (*Nature 1974 (251): pp. 530 – 531: Quantitation of adrenaline in rat brain nuclei and areas by mass fragmentography, Koslow SH and Schlumpf M.*). Jako stresový hormon hraje nezastupitelnou roli v krátkodobých stresových reakcích.
- Celkový počet dopaminergních neuronů se v lidském mozku pohybuje mezi 300 000 – 400 000. Nacházejí se ve čtyřech hlavních jádrech lokalizovaných především v mesencefalu a tvoří tři hlavní projekční dráhy. Nigrostriatální dráha, ovlivňující kontrolu volní motoriky, je tvořena zejména projekcemi neuronů substantia nigra projikujících do striata. Neurony ventrální tegmentální oblasti projikují do limbických struktur (nucleus accumbens) prefrontálního a cingulárního kortexu a představují mesolimbický (mesolimbokortikální) dopaminergní systém. Dopaminergní neurony nucleus accumbens hypothalamu projikují do podvěsku mozkového pak představují tuberoinfundibulární dopaminergní systém. Poslední dva jmenované dopaminergní systémy ovlivňují kognitivní a behaviorální procesy. Dopaminergní neurony

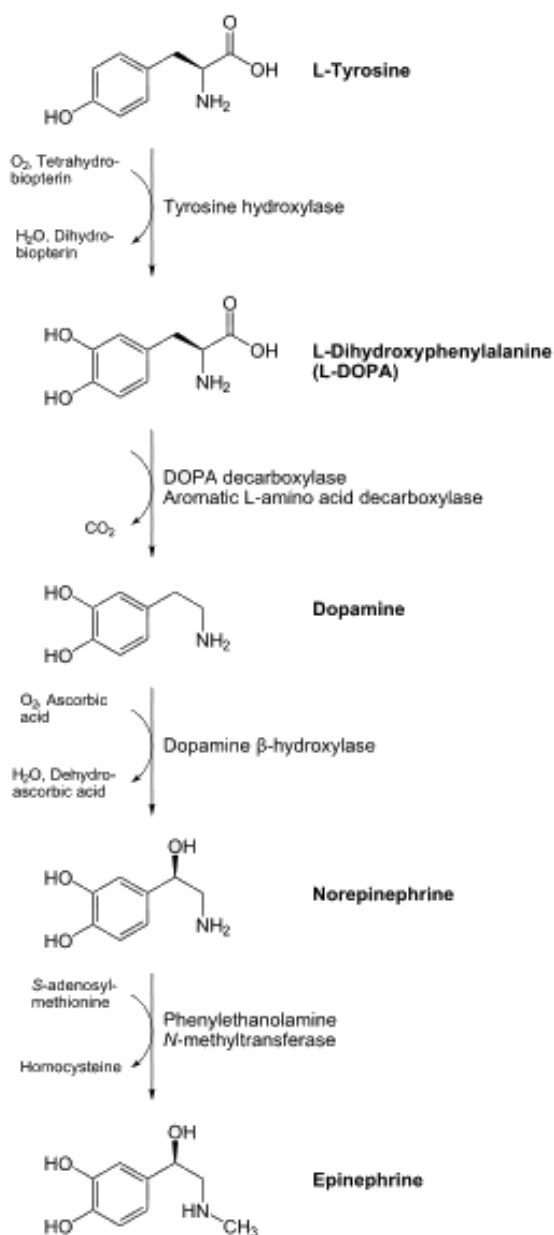
hypothalamu ovlivňují také vegetativní a hormonální funkce. V rámci CNS využívají dopaminergní přenos i periglomerulární buňky čichových bulbů či amakrinní buňky sítnice.

Syntetické dráhy

Katecholaminy jsou molekuly s katecholovým jádrem a ethylaminovou skupinou připojenou na uhlíku 1 tohoto jádra. Jsou syntetizovány z aminokyslinového prekursoru tyrosinu, který je aktivně transportován do mozku a vysoce koncentrován v katecholaminergních neuronech. Tam je na pozici 3 hydroxylován enzymem **tyrosinhydroxylasou (TH)** na dihydroxyfenylalanin (dopa). Tyrosinhydroxylasa je homotetramer, který ke své funkci potřebuje jako kofaktor Fe^{2+} , molekulární kyslík a tetrahydrobiopterin (donor vodíku). Tento enzym je inhibován **α -methylparatyrosinem (AMPT)** využívaným v laboratorním studiu katecholaminergních funkcí (lidských i zvířecích). V dopaminergních neuronech pak syntetická dráha pokračuje už jen jedním enzymem, dekarboxylasou aromatických kyselin (L-aromatic acid decarboxylase, **AADC**), která konvertuje dopa na dopamin. AADC je cytoplasmatický enzym, který ke své funkci potřebuje pyridoxalfosfát (derivát vitamínu B₆) a původně byl označován jako dopa/L-dopa dekarboxylasa, než se ukázalo, že dekarboxyluje daleko větší množství substrátů.

V noradrenergických neuronech syntetická dráha pokračuje konverzí dopaminu na noradrenalin (NA) enzymem dopamin- β -hydroxylasou (**DBH**). DBH potřebuje ke své funkci jako kofaktory Cu^{2+} a kyselinu askorbovou (vitamín C). Z některých studií zabývajících se sympatetickými neurony nebo dření nadledvin se zdá, že DBH je asociována i s vácíky, které obsahují NA připravený k výlevu; některé vácíky DBH spolu s NA skutečně uvolňují. Zda se tento jev vyskytuje i v savčím CNS ale není zatím doloženo.

V noradrenergických neuronech a dření nadledvin syntetická dráha dále pokračuje enzymem označovaným jako fenylethanolamin-*N*-methyltransferasa (PNMT), který přeměňuje NA na adrenalin. Tohoto kroku se jako kofaktor účastní *S*-adenosyl-L-methionin, donor methylové skupiny.



Funkční charakteristiky jednotlivých enzymů máte v tabulace. Nejprísněji je z nich regulována tyrosinhydroxylasa.

Tyrosinhydroxylasa

TH je tzv. rate-limiting (rychlost syntézy určujícím) enzymem syntézy všech katecholaminů. Kódování tohoto enzymu a regulace jeho aktivity se tedy přirozeně staly předmětem intenzivního výzkumu. Obecně, po aktivaci noradrenergního neuronu/dřevě nadledvin dochází k výraznému zvýšení aktivity TH, které je regulováno na úrovni transkripce, translace i postranlačních úprav.

Rychlé, krátkodobé regulace aktivity TH se dějí cestou postranlačních úprav: fosforylací a defosforylací na nejméně 4 rozdílných aminokyselinových zbytcích serinu v N-koncové oblasti proteinu. Tato místa může fosforylovat nejméně 9 různých preteinkinas včetně proteinkinasy A, Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasy II nebo proteinkinasy C. Tyto kinasy navozují změny vedoucí k vyšší afinitě TH k tetrahydrobioterinu a naopak snižují afinitu TH ke katecholaminům, které způsobují inhibici TH (end-product inhibition), jsou-li produkovány ve vyšším množství. Po fosforylací tedy vzrůstá aktivita TH a s ní i koncentrace dopaminu, NA či A v buňkách. Extracelulární signály či farmaka aktivující proteinkinasy a fosfatasy tedy mohou ovlivňovat objem produkováných katecholaminů.

Dlouhodobější změny v katalytické aktivitě TH se dějí cestou regulace transkripce. Gen pro TH může být regulován neurotransmitery, hormony či drogami. Přepis genu pro TH zvyšují **chronický stres, kofein, nikotin** či **morfin**, naopak jej snižují např. **antidepresiva**. Tyto různorodé stimuly aktivují či potlačují transkripční regulační oblasti v promotoru TH genu. Tento promotor obsahuje několik DNA-regulačních oblastí jako jsou CRE, GRE, AP-1 nebo NF- κ B místa. Z nich hraje asi nejdůležitější roli v odpovědi TH promotoru na fyziologické či farmakologické stimuly **CRE** (c-AMP responsive element). Zvýšená exprese TH následně vede ke zvýšené produkci katecholaminů. Regulace TH exprese vnější faktory (enviromentální stres, psychotropní látky) je jedna z nejlépe prozkoumaných oblastí adaptivních změn, které mohou po vnějších signálech nastat v neuronech na úrovni translace.

Za normálních dietárních podmínek s dostatečným přísunem aminokyselin je např. TH saturována hladinou cirkulujících tyrosinu. Ačkoliv množství periferně podaného tyrosinu cirkulujícího v krvi, který překročí BBB a dostane se k mozkovému parenchymu, je limitováno aktivitou transportérů pro dopamin, nenastává při běžném dietárním vstupu problém: tento transportér je saturován už při koncentracích nižších než fyziologických. Zvýšené „dodávky“ tyrosinu pak nevedou ke zvýšenému přenosu tyrosinu do CNS a zvýšené syntéze katecholaminů. Ta se ovšem dá zvýšit periferním podáním L-dopa (levodopa), která prochází hematoencefalickou bariérou (léčba parkonsonismu).

TH je proteinem rodiny hydroxylas aminokyselin, stejně jako např. tryptofanhydroxylasa, rate-limiting enzym zapojený do syntézy serotoninu. Dalším zástupce této rodiny je fenylalaninhydroxylasa, enzym konvertující alanin na tyrosin. Mutace tohoto enzymu výrazně redukuje jeho aktivitu vedou u postižených jedinců k fenylalanemii (**fenylketonurii**), které, pokud není léčena, vede již neonatálně k těžké mentální retardaci. Porucha degradace fenylalaninu ústí v hromadění fenylketonů a jiných oxidovaných derivátů, které působí neurotoxicky.

Ale zpět k tyrosinhydroxylase. Z lidského materiálu sou známy 4 sestříhové varianty TH, ačkoliv jejich funkční význam zatím nebyl objasněn. U hlodavců byla prokázána jen jedna isoforma TH. Kromě regulace sestříhu dochází u TH také k regulaci stability mRNA enzymu nebo k regulaci rychlosti jeho translace.

Degradativní dráhy

Katecholaminy mohou být odbourávány enzymaticky, nicméně hlavním mechanismus končící jejich působení v synaptické štěrbině představuje jejich zpětné vychytávání do nervového zakončení. Hlavní produkty katabolismu katecholaminů zahrnují kyselinu homovanilovou (HVA), 3-methoxy-4-hydroxy-mandlovou kyselinu (VMA) a 3-methoxy-4-hydroxy-fenylglykol (MHPG). Hladiny těchto metabolitů byly dříve stanovovány v CSF, krevní plazmě a moči jako katecholamiergní měřítko deprese a schizofrenie. Jejich hladiny ale kolísají mj. v závislosti na funkci sympatiku, takže jejich využití je poněkud limitované.

Katecholaminy jsou na své aldehydové deriváty měněny enzymem monoaminoxidasou, a mohou být katabolizovány i katechol-*O*-methyltransferasou.

Monoaminoxidasa

Monoaminoxidasa (MAO) je hlavní degradativní enzym katecholaminů. Ke své funkci potřebuje flavinadenindinukleotid (FAD) jako kofaktor. MAO se vyskytuje intra- i extracelulárně, a její inhibicí lze dosáhnout jak zvýšení množství katecholaminů v nervovém zakončení, tak prodloužení jejich dostupnosti pro receptory v synaptické štěrbině.

Byly popsány dvě isoformy MAO: MAO_A a MAO_B. Pocházejí z různých genů na X chromosomu a liší se biochemickými charakteristikami jako substrátovou specifikou, buněčnou lokalizací či citlivostí k různým farmakům. MAO_A mRNA se nachází téměř výhradně v noradrenergických neuronech (sympatetická ganglia, locus coeruleus). MAO_B mRNA se vyskytuje zejména v serotoninergních neuronech raphe nuclei nebo histaminergních neuronech hypothalamu. Kupodivu, zdá se že ani jeden z genů pro MAO není exprimován v dopaminergních neuronech. Sdílejí asi 70% sekvenční homologii.

Oba isoenzymy se liší také afinitou k substrátům. MAO_A vykazuje silnou afinitu k noradrenalinu a serotoninu, a MAO_B má nejvyšší afinitu pro β-fenylethylamin, endogenní amin mozkové tkáně. β-fenylethylamin se ovšem vyskytuje v minimálním počtu neuronů, takže je nejisté, zda jde o pravý substrát MAO_B. MAO_A i MAO_B vykazují stejnou afinitu k dopaminu.

Většina inhibitorů MAO je neselektivních a blokuje obě isoformy enzymu. Patří mezi ně např. **fenelzin**, **tranylcypromin** nebo **isokarboxazid**. První testovaný inhibitor MAO, **iproniazid**, byl už v kolem roku 1900 používán v léčbě tuberkulózy. Ačkoliv na mykobakterie neúčinkoval, ukázal, že mnoho pacientů s TBC trpí depresemi. Dnes už klinicky využíván není, neboť poškozuje játra, nicméně další inhibitory MAO v léčbě depresí a panických stavů používány jsou. Inhibitory MAO jsou používány i k léčbě parkinsonismu, nicméně produkují poměrně vážné vedlejší účinky. Mezi tyto inhibitory MAO patří **tranylcypromin** nebo **deprenyl (selegilin)**. V terapii tzv. atypické deprese mohou být efektivnější než tricyklická antidepresiva.

MAO se vyskytují nejen v CNS, ale i na periférii. MAO_A je exprimována i ve střevě či játrech, kde katabolizuje aminy z potravy. Některé potraviny (staré zráním či fermentovaná – vína, sýry) obsahují mnoho biogenních aminů, jako je např. tyramin. Pokud jedinec užívá inhibitory MAO, může u něj dojít při konzumaci takovýchto potravin k tzv. hyperadrenergní krizi projevující se těžkými bolestmi na prsou, hypertenzí a bolestmi hlavy. Je způsobena tím, že tyto aminy se cirkulující krví mohou být v sympatetických nervových zakončeních vychytány transportéry pro noradrenalin a způsobit masivní výlev NA z terminál sympatiku, stejně jako uvolnění adrenalinu ze dřeně nadledvin.

Z důvodu těchto dietárních omezení (nutnost vyloučit tyramin z potravy) byly vyvinuty reverzibilní inhibitory MAO_A. Bývají označovány akronymem **RIMA** (RIMAs) a patří mezi ně např. **meclobemid**. Jsou užívány jen v Evropě a mají nižší terapeutický efekt.

Přehled inhibitorů MAO:

A) Farmaceuticky využívané

Neselektivní MAO inhibitory

Hydrazinové:

- Benmoxin (Nerusil, Neuralex)
- Hydralazine (Apresoline)
- Iproclozide (Sursum)
- Iproniazid (Marsilid, Iprozid, Ipronid, Rivivol, Propilniazida)
- Isocarboxazid (Marplan)
- Isoniazid (Laniazid, Nydrazid)
- Mebanazine (Actomol)
- Nialamide (Niamid)
- Octamoxin (Ximaol, Nimaol)
- Phenelzine (Nardil, Nardelzine)
- Pheniprazine (Catron)
- Phenoxypropazine (Drazine)
- Pivalylbenzhydrazine (Tersavid)
- Procarbazine (Matulane, Natulan, Indicarb)
- Safrazine (Safra)

Non-hydrazinové:

- Caroxazone (Surodil, Timostenil)
- Echinopsidine (Adepren)
- Furazolidone (Furoxone, Dependal-M)
- Linezolid (Zyvox, Zyvoxam, Zyvoxid)
- Tranylcypromine (Parnate, Jatrosom)

Selektivní MAO_A inhibitory

- Brofaromine (Consonar)
- Metralindole (Inkazan)
- Minaprine (Cantor)
- Moclobemide (Aurorix, Manerix)
- Pirlindole (Pirazidol)
- Toloxatone (Humoryl)

Selektivní MAO_B inhibitory

- Lazabemide (Pakio, Tempium)
- Pargyline (Eutonyl)
- Rasagiline (Azilect)
- Selegiline (Deprenyl, Eldepryl, Emsam)

B) Rostlinné deriváty

Neselektivní MAO inhibitory

- Curcumin (found in turmeric)

- Harmala alkaloids (found in tobacco, syrian rue, passion flower, ayahausca, and Tribulus terrestris)
 - Harmine, Harmaline, Tetrahydroharmine, Harmalol, Harman, Norharman, etc
- Rhodiola Rosea (active constituent(s) unknown)

Selektivní MAO_B inhibitory

- Catechin (found in the tea plant, cocoa, and cat's claw)
- Desmethoxyyangonin (found in kava)
- Epicatechin (also found in the tea plant, cocoa, and cat's claw)
- Fo-Ti (active constituent(s) unknown)
- Hydroxytyrosol (found in olive oil)
- Piperine (found in pepper)

Neznámá selektivita

- Ginkgo Biloba (active constituent(s) unknown)
- Liquorice (active constituent(s) unknown)
- Myristicin (found in nutmeg, parsley, and dill)
- Siberian Ginseng (active constituent(s) unknown)
- St. John's Wort (active constituent(s) unknown)
- Yerba Mate (active constituent(s) unknown)
- Yohimbe (active constituent(s) unknown)

C) Experimentální sloučeniny

Neselektivní MAO inhibitory

- +Hydrazines
 - Metfendrazine
 -

Selektivní MAO_A inhibitory

- Amiflamine
- Bazinaprine
- Befloxatone
- Befol
- Cimoxatone
- Clorgyline
- Esuprone
- Methylene Blue
- Sercloremine
- Tetrindole
- Tyrima

Selektivní MAO_B inhibitory

- D-Deprenyl
- Ladostigil
- Milacemide
- Mofegiline

Katechol-O-methyltransferasa

Katechol-O-methyltransferasa (COMT) se nachází v synaptické štěrbině. Methyduje katecholaminy a jako donor methylové skupiny potřebuje *S*-adenosylmethionin. Hladinu katecholaminů v synaptické štěrbině zvyšují a jejich receptorové účinky prodlužují inhibitory COMT jako **entacapon** nebo **tolcapon**. Velmi ojediněle se podávají spolu s levodopou při léčbě parkinsonismu.

Skládování, uvolňování a zpětné vychytávání katecholaminů

Většina katecholaminů se nevyskytuje v periakryonech katecholaminergních neuronů. Enzymy zapojené do jejich syntézy jsou transportovány do nervového zakončení a většina katecholaminů je syntetizována tam. V dopaminergním nervových zakončeních je dopamin (DA) z cytoplasmy do váčků přenášen vesikulárními transportéry monoaminů (VMATs) a DA synapse si udržují „zásoby“ neuropřenašeče, který je chráněn proti rychlému odbourání pomocí MAO. V noradrenergických zakončeních je dopamin konvertován na noradrenalin dopamin- β -hydroxylasou obsaženou ve váčcích.

Byly naklonovány dva lidské VMATs: VMAT1 (526 aminokyselin) vyskytující se ve dřeni nadledvin a dalších neuroendokrinních tkáních vyjma mozku, a VMAT2 (515 aminokyselin) exprimovaný v mozku. Tyto transportéry inhibují látky jako **reserpin** nebo **tetrabenazin**, čím navozují nedostatek katecholaminů v synaptické štěrbině. To může mít poměrně rychlý fyziologický efekt – třeba prudký pokles krevního tlaku. Reserpin je jedno z nejlépe popsáných antihypertenziv, byl též prvním klinicky dostupným antipsychotikem. Dnes je v klinické praxi velmi vzácný, neboť až 15% pacientů užívajících reserpin začalo trpět těžkými depresemi, způsobenými pravděpodobně hlubokou deplecí katecholaminů i serotoninu.

Membránové transportéry katecholaminů

Membránové transportéry katecholaminů (DAT a NET) jsou transmembránové proteiny vychytávající katecholaminy ze synaptické štěrbině zpět do nervového zakončení. Rychlé odstranění katecholaminů je velice důležité: jednak limituje dobu aktivace presynaptických a postsynaptických receptorů, dále omezuje difuzi katecholaminů ze synaptické štěrbině a konečně umožňuje znovuvyužití takto zpětně vychytaného neuropřenašeče.

DAT i NET jsou cíle dvou velkých tříd psychotropních látek. Tricyklická a příbuzná **antidepresiva** zpočátku blokují NET a serotoninový transportér, psychostimulancia jako **kokain** blokují DAT, NET i serotoninové transportéry. Jiná psychostimulancia jako **amfetamin** naopak slouží těmto transportérům jako substráty a zvyšují vychytávání neuropřenašeče ze synaptické štěrbině.

Transportér pro noradrenalin

Lidský transportér pro noradrenalin (NET) je transmembránový protein s 12 segmenty o délce 617 aminokyselin. Obsahuje tři extracelulární glykosylovaná místa s jedno serin-threoninové fosforylační místo cytoplasmatické. Z rodiny neuropřenašečových transportérů je strukturně nejpříbuznější transportéru pro dopamin. mRNA tohoto transportéru je detekovatelná zejména v locus coeruleus, ale nachází se i v dalších noradrenergických oblastech

(laterální tegmentum, ncl. tractu solitaris). NET vzniká v perikaryonu a na terminálu je posléze dopraven axonálním transportem.

Imunohistochemie NET zatím díky nedostatku specifických protilátek poněkud pokulhává, takže lokalizace NET je prováděna zejména za užití vysoce selektivní radioligandu NET, jímž je [³H]nisoxetin. Pomocí [³H]nisoxetinu byla autoradiograficky prokázána vazba na NET v locus coeruleus, anteroventrálním thalamicím jádře a také ve striatu. Zajímavé je, že NET se zřejmě nachází i v nucleus dorsalis raphe; toto jádro je primárním zdrojem serotoninu v mozku. Souvisí to pravděpodobně s bohatou noradrenergí inervací ncl. dorsalis raphe.

Na NET se s vysokou afinitou váží mnohá antidepresiva: **desipramin**, **imipramin**, **amitriptylin** či **nortriptylin**. Jako antidepresiva jsou užívány i novější inhibitory jako **venlafaxin** nebo **reboxetin**.

Transportér pro dopamin

Lidský transportér pro dopamin (DAT) je protein o délce 620 aminokyselin s předpokládanými 12 transmembránovými doménami, 2-4 extracelulárními glykosylačními místy a až pěti serin-threoninovými fosforylačními místy. Vůči transportéru pro noradrenalin vykazuje 66% homologii, nicméně s ostatními transportéry pro neuropřenašeče je homologní podstatně méně. DAT hraje kritickou roli v udržování homeostázy dopaminergních mozkových systémů. Myši knock-outované pro DAT vykazují mnohé kompenzační enzymové adaptace, které mají za úkol snižovat hladinu dopaminu v synaptické štěrbině, nicméně i tak jsou hyperaktivní a jeví i jiné známky hyperdopaminergního stavu.

Expres DAT byla prokázána výhradně v těch oblastech mozku, kde je dopamin i syntetizován, tj. zejména v substantia nigra a ventrální tegmentální oblasti. Menší míry dosahuje v ncl. arcuatus, čichovém laloku a vnitřní jaderné vrstvě sítnice.

DAT je s membránou asociovaný protein lokalizovaný na presynaptické membráně nervového zakončení. Může se nacházet i na membráně dendritů a tam také sloužit k vychytávání uvolněného dopaminu. K podivu, imunochemicky byl prokázán i v membráně axonů, kde k vápníkem spouštěnému výlevu dopaminu docházet nemůže. Na této membráně možná slouží jako reversní transportér: přenáší dopamin *ven* z axoplasmy. Jakkoliv je to hypotéza poněkud kontroverzní, experimentálně byl tento typ transportu pomocí DAT prokázán.

Funkce transportéru pro dopamin byla studována v několika neuropsychiatrických oblastech – zejména v těch, které souvisí s drogovou závislostí a Parkinsonovou chorobou. **Kokain** se váže na DAT a blokuje vychytávání dopaminu ze synaptické štěrbiny, jak už jsme se zmiňovali. Vazebné místo kokainu na DAT není shodné s vazebným místem pro dopamin; toto svádí k možnému nalezení látek, které by antagonizovaly účinek kokainu podobně vazbou na jiné vazebné místo, aniž by ovlivnily zpětné vychytávání dopaminu. Takovito „antagonisté kokainu“ by byli velice užitečným klinickým nástrojem.

Degenerace dopaminergních neuronů substantia nigra je spojena deplecí dopaminu ze striata a s progresivní ztrátou motorické kontroly, již se vyznačuje Parkinsonova choroba. Jeden z modelů Parkinsonovy choroby naznačuje, že by mohla být spojena s akumulací toxinů přenášených právě DAT. Na zvířecích modelech se při studiu parkinsonismu používá **1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)**. Původně byl MPTP objeven jako kontaminant opiátu meperidinu, kdy u lidí závislých na opiátech vyvolával těžké parkinsonické příznaky. Jeho selektivní toxický efekt je popsán. Jelikož je relativně lipofilní, může přecházet přes hematoencefalickou bariéru. V mozku je konvertován na 1-methyl-4-fenylpyridinium (MPP⁺) pomocí MAO_B. Podle některých prací je MAO_B pouze gliální enzym nepřítomný v dopaminergních neuronech. MPP⁺ je následně přenesen do neuronů pomocí

DAT. Na jiný transportér se neváže, takže postiženy jsou jen neurony dopaminergní. V neuronech pak poškozují mitochondrie, a to buď produkcí reaktivních kyslíkových radikálů, nebo inhibicí komplexu I ve vnitřní mitochondriální membráně. Zajímavé je, že myši knock-outované pro DAT nejsou k toxickému působení MPTP citlivé.

Zvýšenou úroveň vazby na DAT prokázaly práce taky v případě **Tourettova syndromu**, choroby vyznačující se motorickými tiky, a o 50-75% nižší vazbu na DAT ve striatu prokázaly studie také v případě **Leschova-Nyhanova syndromu**, což je dědičná porucha spojená s dystonií či kompulzivním sebepoškozováním. Signifikantní pokles vazby ligandu na DAT prokázaly studie i v případě **Rettova syndromu**, což je neurovývojové onemocnění způsobené defektem v remodelaci chromatinu, vedoucí k mentální retardaci, autistickým projevům a motorické dysfunkci. Úprava funkce DAT by mohla v terapiích těchto chorob napomoci.

Receptory

Synapticky uvolněný dopamin nebo noradrenalin, který není rozštěpen v synaptické štěrbině nebo vychytán zpět do terminály, může aktivovat patřičné receptory. Všechny receptory pro katecholaminy náleží do superrodiny receptorů metabotropních, spřažených s G-proteiny. Ačkoliv pro DA i NE byl identifikován jen jeden transportér, receptorových typů bylo vyklonováno více. Každý z receptorů má specifický farmakologický profil, lokalizaci mozku i na periférii, své efekty i roli v normě/patofyziologii CNS.

Strukturně a funkčně patří katecholaminergní receptory mezi metabotropní Rs, tedy receptory spřažené s G-proteiny.

Nomenklatura spojená s adrenergními a dopaminergními receptory je poněkud komplikovaná. Receptory byly typizovány farmakologicky ještě před nástupem klonovacích technik, které definitivně popsaly jednotlivé receptorové subtypy a vedly ke vzniku odlišného klasifikačního schématu. Moderní nomenklatura adrenergních a dopaminergních receptorů je tedy hybridem dvou typů klasifikace.

Klonované **adrenergní** receptory jsou děleny do podskupin α a β , přičemž každá obsahuje několik receptorových subtypů. Každý ze subtypů se vyznačuje rozdílnou reakcí na noradrenalin a adrenalin. Všechny β receptory jsou spřažené s G_s proteiny a většina α receptorů s G_q proteiny. α_2 receptory, obecně spřažené s G_i proteiny, fungují nejen jako heteroreceptory, ale i jako autoreceptory katecholaminergních synapsí. Látky antagonistující α_2 adrenergní receptory, jako **yohimbin**, které zvyšují frekvenci akčních potenciálů noradrenergních neuronů locus coeruleus tím, že blokují autoreceptory, navozují pocity strachu a úzkosti. **Opiáty** a **benzodiazepiny** naopak frekvenci AP v noradrenergních neuronech snižují a mj. tím potlačují úzkostné chování. Ačkoliv tato farmaka ovlivňují mnohé oblasti mozku, má se za to, že právě locus coeruleus a další noradrenergní oblasti podmiňují normální stresovou reakci a reakci na pocity strachu. Mohou hrát roli v neuropsychiatrických projevech spojených s panickými poruchami a posttraumatickou stresovou poruchou (PTSD).

Klonované **dopaminergní** receptory se obvykle klasifikují jako D₁-like a D₂-like. D₁-like receptory zahrnující D₁ a D₅ receptory jsou spřažené s G_s proteiny. D₂-like receptory, zahrnující D₂, D₃ a D₄ receptory, jsou spřažené s G_i proteiny. D₂ receptory, jež jsou zřejmě hlavní autoreceptory dopaminergních neuronů, mají dvě sestřihové varianty: D_{2short} a D_{2long} (jakkoliv jejich funkční odlišnost zatím nebyla popsána.)

Jak už jsme se zmiňovali, ligandy dopaminergních receptorů mají široké klinické využití. **Antipsychotika** první generace jsou antagonisté D₂-like receptorů. D₂-like agonisté

(např. **bromocriptin**) jsou zase užíváni v léčbě parkinsonismu a hyperprolaktémie. V podpůrné léčbě parkinsonismu je využíván i **amantadin**, protichřipková látka stimulující nejspíše cestou antagonismu NMDA receptorů výlev dopaminu. S léčbou Parkinsonovy choroby je ovšem nejvíce spojována L-dopa (levodopa), která prochází z krevního řečiště přes hematoencefalickou bariéru k dopaminergním nervovým zakončením. Tak je konvertována karboxylasou aromatických aminokyselin (AADC) na dopamin. AADC se vyskytuje i na periférii a celkové množství podané levodopy, které účinkuje až na dopaminergních terminálách, snižuje jeho metabolismem jinde. Vznik dopaminu na periférii často evde k nauce a jiným vedlejším efektům, tudíž je levodopa většinou koadministrována zároveň s AADC inhibitory, jako např. s **carbidopou**. Inhibicí AADC na periférii se také zvýší podíl podané levodopy, které se dostane až k dopaminergním nervovým zakončením.

Agonisté D₁ receptorů vyvolávají nauseu a zvracení a jejich klinické využití je tím limitováno. To, že tyto látky působí jako emetika, není udivující - D₁ i D₂ receptory jsou lokalizovány v area postrema mozkového kmene. Proto mohou být antagonisté D₂ receptorů (**kompazin**) používáni jako účinná antiemetika.

Fyziologický a farmakologický aspektů katecholaminergních receptorů je nepřehledně, podobně jako je popsáno velké množství jejich ligandů. My se krátce zastavíme jen u konceptu autoreceptorů (α₂ a D₂ receptory) a na příkladu D₁ i D₂ receptorů si ukážeme, jak i receptory využívající stejný neuropřenašeč mohou vykazovat velice odlišnou distribuci v rámci CNS.

Stručný (a samozřejmě neúplný) přehled farmakologického profilu jednotlivých katecholaminergních receptorových subtypů máte v následujících tabulkách.

Receptor	Pořadí agonistů	Vybraný účinek agonisty	Mechanismus	Agonisté	Antagonisté
α ₁ : A, B, D ⁺	noradrenalin > adrenalin >> isoprenalin	kontrakce hladkých svalů	G _q : phospholipasa C (PLC) ↑, IP ₃ a kalcium ↑	Noradrenalin Fenylephrin Methoxamine Cirazoline Xylometazoline	Alfuzosin Doxazosin Phenoxybenzamine Phentolamine Prazosin Tamsulosin Terazosin
α ₂ : A, B, C	adrenalin ≥ noradrenalin >> isoprenalin	kontrakce hladkých svalů	G _i : adenylyl cyclasa ↑, cAMP ↓	Dexmedetomidine Medetomidine Romifidine Clonidine Brimonidine Detomidine Lofexidine Xylazine Tizanidine Guanfacine Amitraz	Phentolamine Yohimbine Idazoxan Atipamezole
β ₁	isoprenalin > adrenalin = noradrenalin	kontrakce srdeční	G _s : adenylyl cyclasa ↑, cAMP ↑	Noradrenalin Isoprenalin Dobutamin	Metoprolol Atenolol
β ₂	isoprenalin	relaxace	G _s : adenylyl cyclasa ↑, cAMP ↑	Salbutamol	Ritovamina

	> adrenalin >> noradrenalin	hladkého svalu	cyclasa ↑, cAMP ↑	(Albuterol v USA) Bitolterolmesylát Formoterol Isoprenalin Levalbuterol Metaproterenol Salmeterol Terbutaline Ritodrine	Propranolol
β_3	isoprenalin = noradrenalin > adrenalin	zvyšuje lipolýzu	G_s : adenylyl cyclasa ↑, cAMP ↑	L-796568 Amibegron Solabegron	SR 59230A

† α_{1C} receptor není klasifikován. Existoval subtyp označovaný písmenkem „C“, ale ukázalo se, že je identický s jedním z dříve popsanych subtypů. Aby nenastaly zmatky, klasifikace pokračovala písmenkem „D“.

Receptor	Lokalizace	Mechanismus	Agonisté	Antagonisté
D ₁ 466 aa	neostriatum kůra mozková ncl. accumbens	G_s	SKF82958 SKF81297	SCH23390 SKF83566 Haloperidol
D ₂ 443 aa	neostriatum ncl. accumbens	$G_{i/o}$	Bromocriptin	Racloprid Sulpirid Haloperidol
D ₃ 400 aa	neostriatum Callejovy ostrůvky	$G_{i/o}$	Quinpirol 7-OH-DPAT	Racloprid
D ₄ 387 aa	střední mozek amygdala	$G_{i/o}$		Clozapin
D ₅ 477 aa	hippokampus hypothalamus	G_s	SKF39393	SCH23390

Fyziologie katecholamerních receptorů

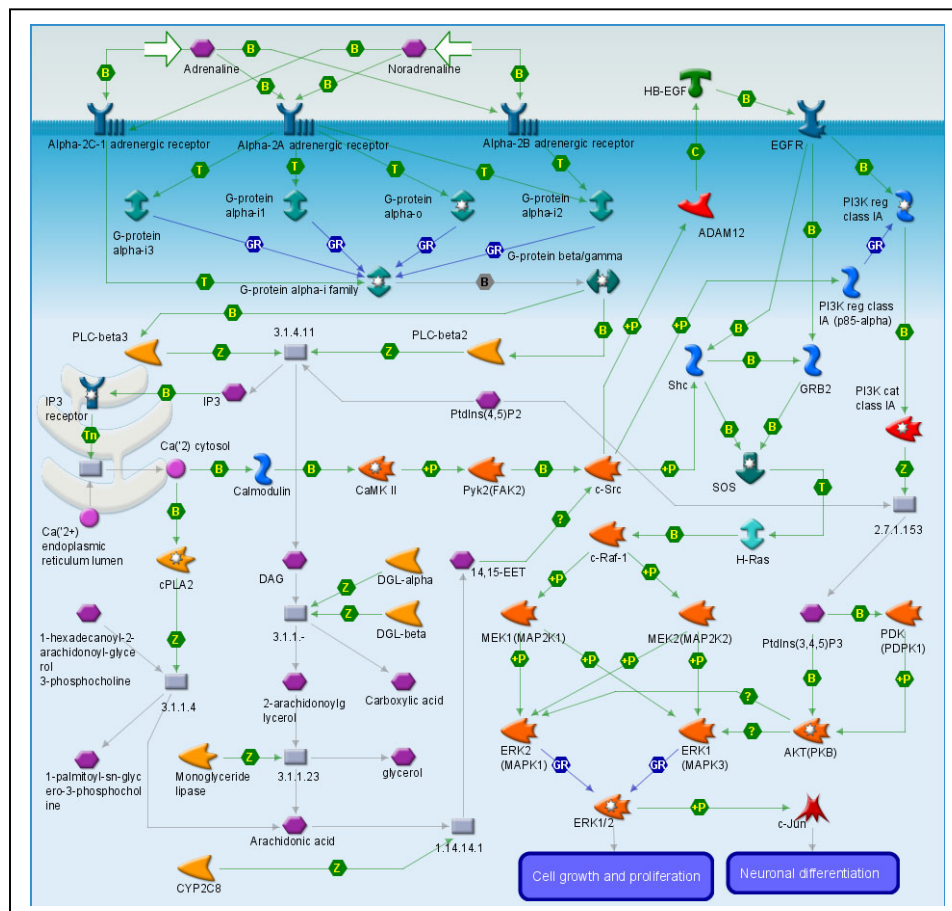
Fyziologické odpovědi vyvolané aktivací katecholaminerních receptorů jsou velmi širokospektré a různorodé (viz obrázek α adrenergní mapy); my se u nich zastavíme jen krátce a ve velmi obecné rovině. Závisí nejen na tom, který receptor je aktivován, ale i na tom, na jakém neuronálním typu se nachází. Lokalizace receptoru ovlivňuje zejména nepřímou regulaci iontových kanálů cestou G-proteinů, kdy závisí na tom, jaká je výbava membrány té které buňky určitými iontovými kanály. Pro ilustraci: iontové kanály inhibované fosforylací proteinkinasou A mohou být převažující v jednom buněčném typu, zatímco iontové kanály fosforylací proteinkinasou A aktivované mohou dominovat v jiné neuronální populaci.

Aktivace β -adrenergických receptorů spřažených s G_s proteiny vede k aktivaci adenylylcyklasy a proteinkinasy A. Podle neuronálního subtypu toto vyvolá buď inhibiční, nebo stimulační efekt. cAMP může regulovat cyklickými nukleotidy ovládané iontové kanály. V mnoha pyramidových buňkách kortexu a v hipokampu aktivace β -adrenergických receptorů vede k uzavírání na vápníku závislých draslíkových kanálů a zvyšuje tak pravděpodobnost excitace pyramidové buňky. V myokardu aktivace β -adrenergických receptorů vede k fosforylaci a aktivaci napětově ovládaných Ca^{2+} kanálů, což podporuje stimulační vliv adrenalinu a noradrenalinu na sílu a rychlost srdečních kontrakcí.

Aktivace α_1 receptorů spřažených s G_q proteiny spouští fosfatidylinositolovou kaskádu. Aktivace α_2 receptorů, obvykle cestou G_i proteinů, inhibuje mnohé neuronální funkce; tento

projev je pravděpodobně spojen s autoreceptorovými funkcemi α_2 receptorů.

Kaskády proteinkinas a proteinfosfat ovlivněných aktivací D_1 -like receptorů jsou velmi různorodé a regulují mnoho typů iontových kanálů. Odpovědi vyvolané aktivací D_2 -like receptorů jsou poněkud uniformnější a většinou vedou k inhibici neuronů např. cestou aktivace dovnitř



usměrňujících draslíkových kanálů. Odpovědi vyvolané D_3 a D_4 receptory jsou zřejmě podobné odpovědím D receptorů.

Autoreceptory

Adrenergní α_2 a dopaminergní D_2 receptory často slouží jako inhibiční autoreceptory buňky, na jejíž membráně se nacházejí. Dopamin uvolňovaný z terminály může cestou D_2 receptorů na tom samém presynaptickém zakončení inhibovat syntézu nebo výlev dalšího množství dopaminu. D_2 receptory tedy zprostředkovávají negativní zpětnou vazbu, kterou je modulována nebo ukončena dopaminergní signalizace vybrané synapse.

Autoreceptory se mohou nacházet nejen v nervovém zakončení, ale i na těle neuronu. Adrenergní α_2 receptory jsou lokalizovány na těle i terminálách neuronů locus coeruleus. V závislosti na své lokalizaci snižují frekvenci akčních potenciálů a výlev noradrenalinu.

Většina autoreceptorů (pokud ne všechny) jsou spřaženy s G_i proteiny a inhibují výlev neuropřenašeče některým z následujících způsobů:

- inhibují napětově ovládané Ca^{2+} kanály
- aktivují dovnitř usměřující K^+ kanály
- inhibují proteinkinasu A a tím mohou přímo ovlivňovat proteiny zapojené do procesu výlevu.

Mechanismus, jakým se inhibice výlevu neuropřenašeče projeví, se může lišit podle toho, kde na neuronu se patříčný autoreceptor nachází.

Distribuce katecholaminergních receptorů v mozku

Každý katecholaminergní receptor má v mozku svůj unikátní distribuční vzor.

Některé receptory, jako např. β_2 adrenergní receptory, jsou difúzně lokalizovány v rámci celého mozku, zatímco D_4 dopaminergní receptory obsahuje jen několik mozkových struktur. My se blíže podíváme na distribuci D_1 a D_2 dopaminergních receptorů.

D_1 a D_2 receptory jsou kódovány odlišnými geny a sdílejí jen asi 29% homologii. Jejich distribuční vzorec v mozku je nicméně velmi podobný. mRNA těchto receptorů je koncentrována zejména v neostriatu. Na mikroskopické úrovni ale segregují do odlišných neuronálních subpopulací. D_1 receptory se vyskytují zejména na striatonigrálních buňkách – GABAergních neuronech, které obsahují také substanci P a dynorfin a projikují do substantia nigra. Naopak, D_2 receptory jsou exprimovány především ve striatopallidálních buňkách – GABAergních neuronech, které projikují do globus pallidus a neobsahují substanci P ani dynorfin, ale spíše neuropeptid enkefalin. Specifita rozložení receptorů ve striatu (a mozku obecně) je tedy odrazem spoju mezi jednotlivými mozkovými strukturami.

Informace o distribuci receptoru v rámci CNS nemůže být odvozena jen do popsání distribuce jeho mRNA. Receptorová mRNA a její korespondující protein nemusí vdy kolokalizovat: např. protilátky proti D_1 receptorům ukazují na vysoké koncentrace proteinu v neostriatu, kde je lokalizována a detekována i jeho mRNA. Nicméně tyto protilátky vykazují imunoreaktivitu i v substantia nigra, kde nebyla detekována mRNA D_1 receptoru. Pokud tedy těla nigrálních buněk neexprimují gen pro D_1 receptor, jak tam vysvětlíme jeho přítomnost naznačovanou imunohistochemicky? Zdá se, že nigrální D_1 receptory nejsou nigrálního úvodu a zřejmě pocházejí z mRNA přepisované a překládané ve striatu a následně axonálně transportované do nigrálních zakončení.

Pomocí technik umožňujících zobrazit vazbu ligandu v intaktní živé tkáni lze prokázat abnormality v expresi receptorů v rámci různých neuropsychiatrických onemocnění (parkinsonismus, schizofrenie). Příkladem mohou být SPECT studie na D_2 receptorech, při kterých antipsychotikum **haloperidol** (antagonista D_2 Rs) kompetuje s radioaktivně značeným specifickým agonistou [^{123}I]-IBZM a postupně jej vyvazuje.

Co si pamatovat z dnešní přednášky

- ⇒ noradrenalin: transportéry, receptory, farmakologie
- ⇒ dopamin: transportéry, receptory, farmakologie
- ⇒ MAO