

ASETYYYLIKOLIININ NIKOTIINIRESEPTORIT VÄLITTÄJÄAINEIDEN  
VAPAUTUMISEN SÄÄTELIJÖINÄ

Sakari Leino  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja toksikologian osasto

Joulukuu 2013

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Farmasian tiedekunta		Laitos/Institution – Department Farmakologian ja toksikologian osasto	
Tekijä/Författare – Author Sakari Leino			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Asetyylikoliinin nikotiinireseptorit välittäjäaineiden vapautumisen säätelijöinä			
Oppiaine / Läroämne – Subject Farmakologia			
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika/Datum – Month and year Joulukuu 2013	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 120
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Asetyylikoliinin nikotiinireseptorit ovat viidestä alayksiköstä muodostuvia ionikanava-reseptoreita, joiden pääasiallinen tehtävä keskushermostossa on välittäjäaineiden vapautumisen säätely. Tämän tutkielman kirjallisuuskatsauksessa esitetään yleiskuva nikotiinireseptorien rakenteesta, toiminnasta ja vaihtelevasta alayksikkökoostumuksesta sekä tarkastellaan tutkimuskirjallisuutta, joka koskee nikotiinireseptoreita välittäjäaineiden vapautumisen säätelijöinä. Katsauksessa käydään läpi oleellisin kirjallisuus striatumin, hippokampuksen ja prefrontaalisen aivokuoren nikotiinireseptorien osuudesta dopamiinin, glutamaatin, GABA:n, asetyylikoliinin, noradrenaliinin ja serotoniinin vapautumisen säätelyssä. Katsauksen lopuksi esitetään yhteenveto kunkin aivoalueen osalta ja joitakin tutkimustiedon perusteella tehtyjä johtopäätöksiä.</p> <p>Tutkielman kokeellinen osa käsittää koesarjan, jonka tarkoituksena oli aiemmin havaittujen opioidi-nikotiini-interaktioiden perusteella tutkia morfiinin kykyä aktivoida hiiren striatumin dopaminergisten hermopäätteiden presynaptisia dopamiinin vapautumista sääteleviä nikotiinireseptoreita. Tämän selvittämiseen pyrittiin mittaamalla radioleimatun dopamiinin vapautumista hiiren striatumista valmistetuista perfusoiduista synaptosomeista. Morfiinin lisäksi tutkittiin nikotiinin vaikutusta menetelmän toiminnan varmistamiseksi ja vertailukohdan saamiseksi. Sekä nikotiinin että morfiinin todettiin lisäävän [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista striataalisista synaptosomeista. Nikotiiniantagonistit estivät morfiinin aiheuttamaa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista viitaten vaikutuksen välittymiseen nikotiinireseptorien kautta. Selektiivistä antagonistia <math>\alpha</math>-konotoksiini MII:a hyödyntäen todettiin morfiinin vaikutuksen välittyneen nikotiinin tapaan osittain <math>\alpha\beta 2^*</math>-tyypin reseptorien kautta ja osittain muiden, mahdollisesti <math>\alpha 4\beta 2^*</math>-tyypin reseptorien kautta. Lisäksi havaittiin opioidiantagonisti naloksonin estävän sekä nikotiinin että morfiinin vaikutuksen todennäköisesti nikotiinireseptoreita salpaamalla. [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumiseen vaikuttavien morfiini- ja naloksonipitoisuuksien todettiin kuitenkin olevan hyvin korkeita. Yhdisteiden mahdollisten presynaptisten nikotiinireseptorien kautta välittyvien striataalista dopamiinin vapautumista säätelevien vaikutusten kliininen merkittävyys lienee näin ollen vähäinen. Vaikutusten välittymisen opioidireseptorien kautta todettiin olevan epätodennäköistä, mutta tätä tai korkeiden pitoisuuksien aiheuttamia epäspesifisiä vaikutuksia ei voitu täysin sulkea pois.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Nikotiinireseptorit, striatum, hippokampus, prefrontaalinen aivokuori, opioidi-nikotiini-interaktiot, synaptosomit, dopamiini			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information  Ohjaaja: Outi Salminen, yliopistonlehtori, FaT, Dos.			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty <b>Faculty of Pharmacy</b>		Laitos/Institution – Department <b>Division of Pharmacology and Toxicology</b>	
Tekijä/Författare – Author <b>Sakari Leino</b>			
Työn nimi / Arbetets titel – Title <b>Modulation of neurotransmitter release by nicotinic acetylcholine receptors</b>			
Oppiaine / Läroämne – Subject <b>Pharmacology</b>			
Työn laji/Arbetets art – Level <b>Master's thesis</b>		Aika/Datum – Month and year <b>December 2013</b>	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages <b>120</b>
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Nicotinic acetylcholine receptors are ion channel receptors that consist of five subunits and have an important role in modulating neurotransmitter release in the central nervous system. The literature review part of this thesis presents an overview of the structure, function and diverse subunit composition of nicotinic receptors and reviews the scientific literature on their function as modulators of neurotransmitter release. Relevant literature on the role of the nicotinic receptors of the striatum, the hippocampus and the prefrontal cortex in the modulation of the release of dopamine, glutamate, GABA, acetylcholine, noradrenalin and serotonin is reviewed. Finally, a summary for each of the brain areas and some conclusions are presented.</p> <p>The experimental part of this thesis consists of a series of experiments, where the ability of morphine to activate the presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the mouse striatum was investigated based on opioid-nicotine-interactions reported earlier. The possible effect of morphine was studied by measuring the release of radiolabeled dopamine from perfused synaptosomes prepared from mouse striatum. In addition, the effect of nicotine was studied to confirm the correct functioning of the method and to obtain data for comparison with the morphine results. Both nicotine and morphine elicited the release of [<sup>3</sup>H]dopamine from striatal synaptosomes. The release of [<sup>3</sup>H]dopamine elicited by morphine was blocked by nicotinic antagonists, suggesting that the effect of morphine was mediated by nicotinic receptors. Use of the selective antagonist <math>\alpha</math>-conotoxin MII revealed that the effect of morphine, similar to nicotine, was mediated in part by <math>\alpha 6\beta 2^*</math> receptors and in part by other receptors, possibly <math>\alpha 4\beta 2^*</math>. In addition, the opioid antagonist naloxone blocked the effects of both nicotine and morphine, likely via direct antagonism of nicotinic receptors. However, the concentrations of morphine and naloxone needed for affecting [<sup>3</sup>H]dopamine release were very high, which suggests that the clinical relevance of the effects described here is likely to be small. The involvement of opioid receptors was deemed to be unlikely but, along with possible non-specific effects by high concentrations, could not be completely ruled out.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Nicotinic receptors, striatum, hippocampus, prefrontal cortex, opioid-nicotine-interactions, synaptosomes, dopamine</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>Faculty of Pharmacy, Division of Pharmacology and Toxicology</b>			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information  <b>Supervisor: Outi Salminen, university lecturer, Pharm.D., Doc.</b>			

1. JOHDANTO .....	1
2. KIRJALLISUUSKATSAUS: Asetyylikoliinin nikotiinireseptorit välittäjäaineiden vapautumisen säätelijöinä .....	2
2.1. Asetyylikoliini.....	2
2.2. Nikotiinireseptorit .....	3
2.2.1. Nikotiinireseptorien rakenne ja alayksikkökoostumus.....	3
2.2.2. Nikotiinireseptorien toimintaperiaate .....	7
2.2.3. Nikotiinireseptorien merkitys hermoston toiminnassa ja sairauksissa .....	10
2.2.4. Reseptorityyppiselektiiviset nikotiiniligandit.....	12
2.3. Nikotiinireseptorit ja välittäjäaineiden vapautumisen säätely.....	13
2.3.1. Striatum .....	15
2.3.1.1. Striatumin rakenne ja nikotiinireseptorit .....	15
2.3.1.2. Dopamiinin vapautuminen striatumissa.....	19
2.3.1.3. Glutamaatin vapautuminen striatumissa.....	25
2.3.1.4. GABA:n vapautuminen striatumissa .....	28
2.3.1.5. Asetyylikoliinin vapautuminen striatumissa.....	29
2.3.1.6. Noradrenaliinin vapautuminen striatumissa .....	29
2.3.1.7. Serotoniinin vapautuminen striatumissa.....	30
2.3.2. Hippokampus.....	31
2.3.2.1. Hippokampuksen rakenne ja nikotiinireseptorit .....	31
2.3.2.2. Dopamiinin vapautuminen hippokampuksessa .....	33
2.3.2.3. Glutamaatin vapautuminen hippokampuksessa.....	35
2.3.2.4. GABA:n vapautuminen hippokampuksessa .....	37
2.3.2.5. Asetyylikoliinin vapautuminen hippokampuksessa.....	39
2.3.2.6. Noradrenaliinin vapautuminen hippokampuksessa .....	39
2.3.2.7. Serotoniinin vapautuminen hippokampuksessa.....	41
2.3.3. Prefrontaalinen aivokuori .....	42
2.3.3.1. Prefrontaalisen aivokuoren rakenne ja nikotiinireseptorit.....	42
2.3.3.2. Dopamiinin vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella.....	43
2.3.3.3. Glutamaatin vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella .....	45
2.3.3.4. GABA:n vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella .....	46
2.3.3.5. Asetyylikoliinin vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella.....	48
2.3.3.6. Noradrenaliinin vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella .....	49
2.3.3.7. Serotoniinin vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella .....	50
2.4. Yhteenveto ja johtopäätöksiä .....	50

3. KOKEELLINEN OSA: Morfiinin stimuloima nikotiinireseptorivälitteinen dopamiinin vapautuminen hiiren striataalisista synaptosomeista .....	57
3.1. Opioidireseptorit .....	57
3.2. Opioidi-nikotiini-interaktiot .....	58
3.3. Opioidien vaikutukset dopamiinin vapautumiseen striatumissa .....	59
3.4. Reseptoritason opioidi-nikotiini-interaktiot ja tutkimuksen tavoitteet .....	63
4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	67
4.1. Materiaalit .....	67
4.2. Koe-eläimet .....	67
4.3. Tutkimusmenetelmä .....	68
4.3.1. Synaptosomiperfuusiolaitteiston toimintaperiaate .....	68
4.3.2. Synaptosomien valmistus hiiren striatumista .....	70
4.3.3. Radioleimatun dopamiinin sisäänotto synaptosomeihin .....	71
4.3.4. Radioleimatun dopamiinin vapautumiskokeet .....	71
4.3.5. Tulosten käsittely .....	73
5 TULOKSET .....	74
5.1. Nikotiinin ja morfiinin stimuloima [ <sup>3</sup> H]dopamiinin vapautuminen .....	74
5.2. [ <sup>3</sup> H]dopamiinin vapautumisen jaottelu kahteen komponenttiin .....	78
6. POHDINTA .....	84
7. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	94
8. KIRJALLISUUSLUETTELO .....	95

## 1. JOHDANTO

Tämä pro gradu -tutkielma koostuu kirjallisuuskatsauksesta sekä kokeellisesta tutkimuksesta. Kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on esittää yleiskuva asetyylikoliinin nikotiinireseptorien rakenteesta, toiminnasta ja vaihtelevasta alayksikkökoostumuksesta sekä käydä läpi kirjallisuutta nikotiinireseptorien merkityksestä hermovälittäjäaineiden vapautumisen säätelijöinä. Katsauksen alussa esitellään lyhyesti asetyylikoliini ja sen eri reseptorit. Seuraavaksi perehdytään hieman tarkemmin asetyylikoliinin nikotiinireseptorien rakenteeseen ja toimintaperiaatteisiin sekä nikotiinireseptorien merkitykseen hermoston toiminnassa. Katsauksen pääosan muodostaa valittujen aivoalueiden mukaan jaoteltu esitys keskushermoston nikotiinireseptoreista useiden eri hermovälittäjäaineiden vapautumisen säätelijöinä. Kirjallisuuskatsauksen lopuksi esitetään yhteenveto ja joitakin johtopäätöksiä.

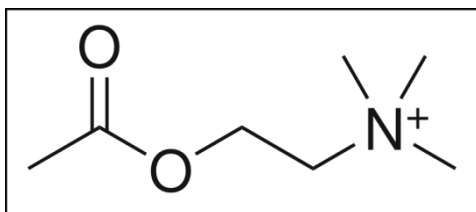
Työn kokeellinen osa käsittää kirjallisuuskatsauksen aihepiiristä osittain eroavan tutkimuksen, jonka tarkoituksena oli selvittää morfiinin mahdollista kykyä aktivoida striatumin alueen dopamiinin vapautumista sääteleviä presynaptisia nikotiinireseptoreita. Tämän tutkimiseksi mitattiin radioleimatun dopamiinin vapautumista hiiren striatumista valmistetuista perfusoiduista synaptosominäytteistä. Tutkimuskysymys perustuu useiden aiempien tutkimusten havaitsemiin opioidi-nikotiini-interaktioihin. Kokeellisen osan johdannossa esitellään aiheeseen liittyvää kirjallisuutta sekä tutkimuksen tavoitteet. Tämän jälkeen esitellään varsinainen tutkimus menetelmineen, tuloksineen ja tulosten tulkintoineen, sekä lopuksi tutkimustulosten perusteella tehdyt johtopäätökset.

## 2. KIRJALLISUUSKATSAUS: Asetyylikoliinin nikotiinireseptorit välittäjäaineiden vapautumisen säätelijöinä

### 2.1. Asetyylikoliini

Asetyylikoliini on yksi keskeisimmistä hermoston välittäjäaineista, ja sen nikotiinireseptorit ovat olleet tieteellisen tutkimuksen kohteena jo yli vuosisadan. Nikotiinin ja lihaksesta löydetyn ”reseptiivisen substanssin” vuorovaikutuksiin liittyvät hypoteesit muodostivat perustan koko reseptorikäsitteen olemassaololle jo kauan ennen asetyylikoliinin identifiointia (Langley 1905; Collins ym. 2009). Intensiivisen tutkimuksen tuloksena on muodostunut hyvinkin seikkaperäinen kuva nikotiinireseptorien monimuotoisuudesta ja niiden fysiologisista ja patofysiologisista rooleista, joskin myös tuntemattomia osatekijöitä on edelleen runsaasti.

Asetyylikoliini (Kuva 1) on etikkahapon ja koliinin esteri, jonka tunnetuin tehtävä on hermovälittäjäaineena toimiminen. Kädellisten keskushermostossa kolinergiset hermoradat ovat pääasiassa luonteeltaan laaja-alaisia ja diffuuseja, hermottavat lähes koko aivoja ja säätelevät lukuisten aivoalueiden hermovälitystä (Dani ja Bertrand 2007; Karczmar 2007). Tärkeimpiä kolinergisia hermoratoja ovat aivorungosta lähtevät projektiot, jotka hermottavat talamusta, keskiaivoja ja aivorungon muita osia, sekä basaalisista etuaivoista lähtevät projektiot, jotka hermottavat hippokampusta, useimpia aivokuoren alueita ja joitakin subkortikaalisia tumakkeita. Tärkeä ja kolinergisten hermosolujen tyypillisestä laaja-alaisesta hermotuksesta poikkeava kolinerginen järjestelmä on myös striatumin interneuronien muodostama hyvin tiheä paikallinen kolinerginen hermotus.



**Kuva 1. Asetyylikoliinin molekyyli rakenne.**

Asetyylikoliini on keskeisessä roolissa myös ääreishermoston toiminnassa, jossa se vastaa hermo-lihasliitosten (Martyn ym. 2009) ja autonomisen hermoston ganglioiden (Mao ym. 2006) nopeasta viestinvälityksestä. Lisäksi asetyylikoliinia esiintyy paitsi hermoston omaavissa eliöissä myös alkeellisemmissä eliöissä kuten bakteereissa ja levissä (Wessler ym. 1999), mikä viittaa asetyylikoliinin kehittymiseen evoluutiossa jo ennen hermoston kehittymistä. Asetyylikoliinilla uskotaankin myös ihmisen elimistössä olevan runsaasti muitakin kuin hermoston toimintaan liittyviä tehtäviä (Wessler ja Kirkpatrick 2008). Asetyylikoliinia ja muita kolinergisen järjestelmän komponentteja esiintyy nimittäin myös monissa ei-hermostollisissa soluissa, kuten epiteeli-, endoteeli- ja immuunisoluissa, missä ne säätelevät muun muassa solujen proliferaatiota, erilaistumista ja migraatiota sekä ionien ja veden kuljetusta.

Asetyylikoliinin vaikutuskohteita hermostossa ovat asetyylikoliinireseptorit, joita on kahta toimintaperiaatteeltaan toisistaan eroavaa tyyppiä. Asetyylikoliinin muskariinireseptorit ovat G-proteiinikytkentäisiä metabotrooppisia reseptoreita, joiden aktivaatio laukaisee toisiolähettikaskadin kohdehermosolun sisällä (Scarr 2012). Muskariinireseptoreita tiedetään olevan viittä alatyyppeä (M1–M5), jotka kytkeytyvät eri toisiolähettijärjestelmiin ja joita ilmentyy laajalti keskushermoston eri alueilla. Asetyylikoliinin nikotiinireseptorit puolestaan ovat ionikanavareseptoreita, joiden aktivaatio johtaa ionikanavan aukeamiseen (Albuquerque ym. 2009). Nikotiinireseptorit esitellään tarkemmin seuraavassa kappaleessa.

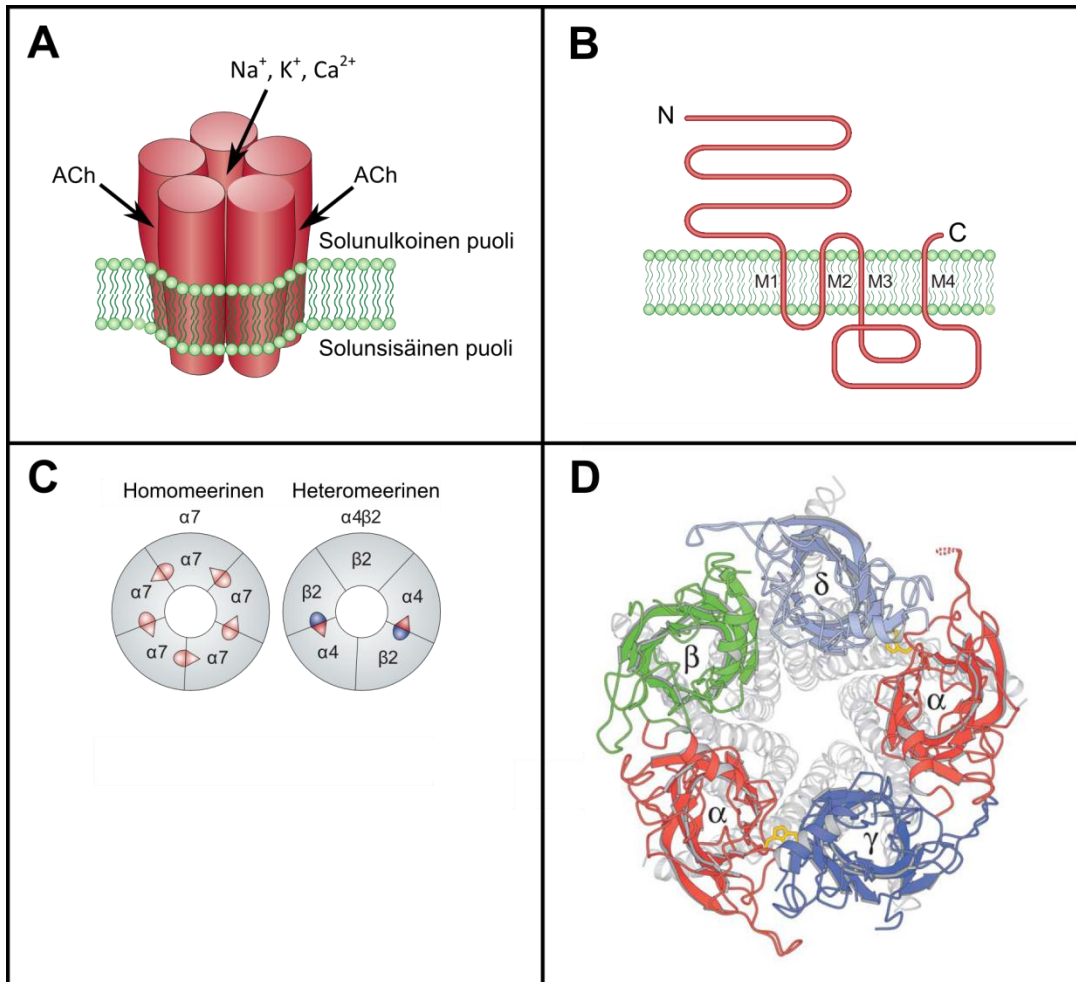
## 2.2. Nikotiinireseptorit

### 2.2.1. Nikotiinireseptorien rakenne ja alayksikkökoostumus

Asetyylikoliinin nikotiinireseptorit (Kuva 2) ovat pentameerisiä eli viidestä alayksiköstä koostuvia nopeasti reagoivia kationisia ionikanavia (Albuquerque ym. 2009; Millar ja Gotti 2009). Jokainen viidestä alayksiköstä sisältää solunulkoisen osan, neljä kertaa solukalvon läpi kulkevan transmembraanisen osan sekä solunsisäisen osan. Nikotiinireseptorin ligandien sitoutumiskohdat sijaitsevat reseptorin solunulkoisessa osassa alayksiköiden rajapinnoilla. Solukalvon läpi kulkevat osat puolestaan muodostavat



vedellä täyttyvän kanavan, joka päästää lävitseen valikoituja ioneja. Reseptorin toiminta perustuu ligandin sitoutumisen muuntumiseen reseptorin liikkeeksi, joka kontrolloi kanavan avautumista ja sulkeutumista ja muuntuu siten soluvasteeksi.



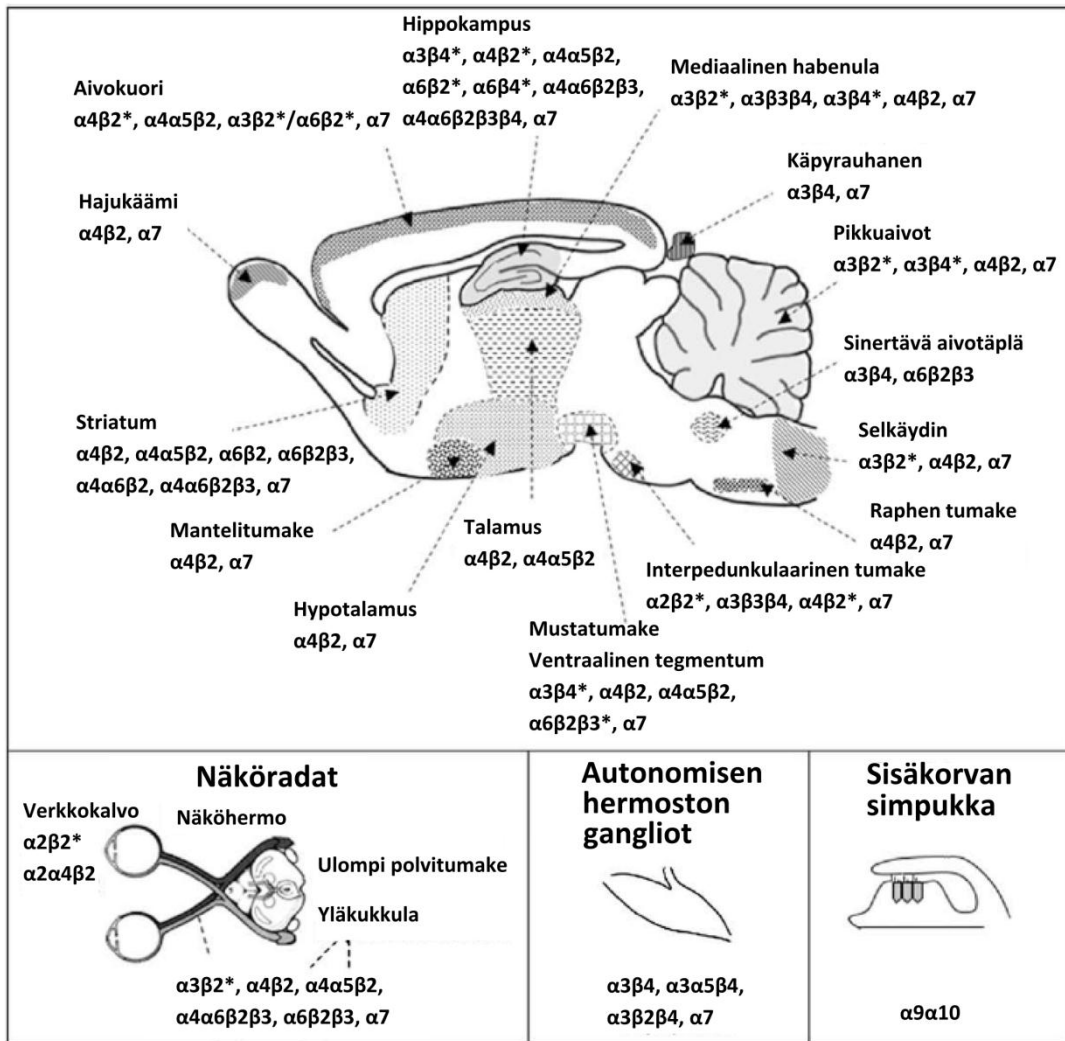
**Kuva 2. Asetyylikoliinin nikotiinireseptorien rakenne.** A: Kaavakuva solukalvon läpi kulkevasta nikotiinireseptorista. Kuvaan on merkitty asetyylikoliinin (ACh) sitoutumiskohdat sekä kanavan läpäisemät ionit. B: Kaavakuva yksittäisen alayksikön rakenteesta. Kuvaan on merkitty alayksikön transmembraaniset osat (M1–M4). C: Kaavakuva nikotiinireseptorin pentameerisestä rakenteesta. Kuvattuna on esimerkki sekä homomeerisestä ( $\alpha 7$ ) että heteromeerisestä ( $\alpha 4\beta 2$ ) reseptorista. Kuvaan on merkitty asetyylikoliinin sitoutumiskohdat alayksiköiden rajapinnoilla. D: *Torpedo marmorata* -rauskun  $\alpha\beta\gamma\delta$ -nikotiinireseptorin elektronimikroskooppisesti määritetty proteiiniirakenne synapsiraon suunnalta katsottuna. Reseptorin solunulkoinen osa on korostettu värein. Kuvan lähteet: A,B,C: Changeux 2010 (muokattu); D: Unwin 2005

Nikotiinireseptorit voivat olla joko homopentameerisiä eli vain yhdestä alayksikkötyypistä koostuvia tai heteropentameerisiä eli useammasta eri alayksikkötyypistä koostuvia (Kuva 2C). Eri alayksikkö- ja reseptorialatyyppejä tunnetaan lukuisia.

Nikotiinireseptorityyppien nimeämisessä noudatetaan yleisimmin käytäntöä, jossa reseptorityyppi nimetään sen sisältämien tunnettujen alayksikkötyyppien mukaan ja tähdellä merkitään mahdollisuutta, että reseptori sisältää myös muita alayksikkötyyppejä (esim.  $\alpha_4\beta_2^*$ ; Lukas ym. 1999). Tarvittaessa reseptorityypin nimeen voidaan sisällyttää myös reseptorin alayksiköiden tarkka stoikiometria (esim.  $\alpha_3\beta_2$ ).

Selkärankaisilla tunnetaan 17 homologista mutta geneettisesti toisistaan eroavaa alayksikkötyyppiä ( $\alpha_1$ – $\alpha_{10}$ ,  $\beta_1$ – $\beta_4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), jaottelun perustuessa osin tutkimushistoriaan ja osin eroihin alayksiköiden aminohapporakenteessa (Albuquerque ym. 2009; Collins ym. 2009; Millar ja Gotti 2009). Alayksikkötyypit  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , ja  $\epsilon$  esiintyvät vain hermo-lihasliitoksissa, missä ne muodostavat kahden tyyppisiä reseptoreita ( $\alpha_1\beta_1\delta\gamma$  ja  $\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$ ). Muut 12 alayksikkötyyppiä ( $\alpha_2$ – $\alpha_{10}$ ,  $\beta_2$ – $\beta_4$ ) osallistuvat hermostollisten eli keskushermoston ja autonomisten ganglioiden nikotiinireseptorien muodostamiseen. On kuitenkin huomattava, että alayksikköä  $\alpha_8$  on havaittu vain linnuilla (Albuquerque ym. 2009) ja että on näyttöä siitä, ettei myöskään alayksikkötyyppejä  $\alpha_9$  ja  $\alpha_{10}$  ilmenny nisäkkään aivoissa (Collins ym. 2009).

Nikotiinireseptorien alayksikkötyyppien suurta lukumäärää heijastaen heterologisissa järjestelmissä ilmentyvät kloonatut alayksiköt kykenevät muodostamaan lähes rajattoman määrän erilaisia yhdistelmiä (Albuquerque ym. 2009). Myös eläinkokeissa on löydetty suuri määrä erilaisia nikotiinireseptoreita. Esimerkiksi Millarin ja Gottin (2009) katsauksessa on lueteltu lähes 30 selkärankaisen hermostosta immunokemiallisin keinoin havaittua reseptorityyppiä. Määrä on kuitenkin varsin vähäinen verrattuna alayksikköyhdistelmien teoreettiseen määrään, ja nikotiinireseptorien ilmentyminen *in vivo* onkin hyvin tarkkaan säädeltyä. Alayksiköiden DNA:n transkription solukohtainen säätely, alayksiköiden täsmällinen yhteenliittäminen ja translaation jälkeinen säätely mahdollistavat heikosti tunnetuilla mekanismeilla ainoastaan tiettyjen aivoalueen ja solutyyppien mukaisten alayksikköyhdistelmien muodostumisen (Albuquerque ym. 2009).



**Kuva 3. Nikotiinireseptorien ilmentyminen jyr sijän hermostossa.** Kuvaan on merkitty nikotiinireseptorityypit, joiden on havaittu ilmentyvän jyr sijän keskushermoston eri alueilla (yllä) sekä näkoradoissa, autonomisen hermoston ganglioissa ja sisäkorvan simpukassa (alla). Kuvan lähde: Millar ja Gotti 2009 (käännetty suomeksi ja täydennetty tämän katsauksen käsittelemien aivoalueiden osalta)

Nikotiinireseptorin alayksikkökoostumus määrittää muun muassa reseptorityypin affiniteetin eri ligandeille ja sen myötä ligandien selektiivisyyden reseptorityyppiä kohtaan (Albuquerque ym. 2009). Suurin osa hermostollisista nikotiinireseptoreista on joko homomeerisiä  $\alpha 7$ -reseptoreita tai vain yhden  $\alpha$ -tyypin ja yhden  $\beta$ -tyypin alayksiköistä koostuvia heteromeerisiä reseptoreita (Millar ja Gotti 2009). Nisäkkäällä on yleisimmät heteromeeriset reseptorityypit ovat  $\alpha 4\beta 2$  keskushermostossa ja  $\alpha 3\beta 4$  autonomisen hermoston ganglioissa.  $\alpha 4\beta 2$ -reseptorista uskotaan lisäksi ilmentyvän sekä korkean herkkyyden ( $\alpha 4_2\beta 2_3$ ) että matalan herkkyyden ( $\alpha 4_3\beta 2_2$ ) muotoja (Gotti ym. 2008). Useammasta kuin kahdesta alayksikkötyypistä koostuvia reseptoreita (esim.

$\alpha 4\beta 2^*$  tai  $\alpha 6\beta 2^*$ ) esiintyy paikallisesti monilla aivoalueilla. Kuvassa 3 on esitetty väistämättä epätäydellinen yhteenveto jyrksijän nikotiinireseptorien ilmentymisestä Millarin ja Gottin (2009) katsausta mukaillen. Huomattavaa on, että lajien väliset erot reseptorialatyypin ilmentymisessä eivät ole harvinaisia. Esimerkiksi jyrksijöissä harvinaisen  $\alpha 2$ -alayksikön on havaittu ilmentyvän laajalti kädellisten aivoissa, ja  $\alpha 2\beta 2^*$ -reseptorien on jopa esitetty yhdessä  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien kanssa muodostavan valtaosan kädellisten nikotiinireseptoreista (Han ym. 2000).

### 2.2.2. Nikotiinireseptorien toimintaperiaate

Nikotiinireseptorin asetylikoliinia sitovat kohdat ovat vierekkäisten alayksiköiden rajapinnoille muodostuvia hydrofobisia taskuja (Albuquerque ym. 2009). Homopentameerisissa reseptoreissa on viisi ja heteropentameerisissä reseptoreissa kaksi sitoutumiskohtaa. Toinen sitoutumiseen osallistuvista alayksiköistä on aina  $\alpha$ -alayksikkö, joka muodostaa pääosan sitoutumiskohdasta. Heteromeerisissä reseptoreissa toinen alayksikkö voi olla  $\beta 2$ ,  $\beta 4$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  tai  $\epsilon$ . Sitoutumiskohtia muodostavien alayksiköiden lisäksi nikotiinireseptoreissa esiintyy myös alayksiköitä  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  ja  $\beta 3$ , jotka eivät suoraan osallistu ligandien sitomiseen mutta kuitenkin vaikuttavat siihen.

Ligandin sitoutuessa nikotiinireseptoriin ionikanava avautuu mikrosekunneissa. *Torpedo marmorata* -rauskun nikotiinireseptorin elektronimikroskooppikuvien ja tietokonemallien perustella on esitetty kanavan avautumisen ja sulkeutumisen olevan monimutkainen ja useista osista koostuva prosessi (Unwin 2005; Albuquerque ym. 2009). Ligandin sitoutuessa sitoutumiskohdassa tapahtuu vetysidosten uudelleenjärjestäytyminen, jonka seurauksena hydrofobiset sivuketjut sulkevat sitoutumiskohdan ja ligandi jää satimeen reseptorin sisälle. Syntynyt pyörimisliike kulkeutuu reseptorin solunulkoiseen osaan ja muuntuu kanavahuokosen muodostavien transmembraanisten osien pyörimisliikkeeksi, mistä lopulta seuraa huokosen tukkivien hydrofobisten aminohappotähteiden väliaikainen siirtyminen, huokosen halkaisijan kasvaminen ja ionivirtaa tukevien hydrofiilisten aminohappotähteiden siirtyminen huokoseen.

Reseptorin aktivoituessa ja ionikanavan avautuessa pienikokoisia kationeja ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) pääsee virtaamaan kanavan läpi. Hermo-lihasliitoksessa motorisesta hermopäätteestä vapautuneen asetyylikoliinin sitoutuminen lihaksen päätelevyn nikotiinireseptoriin johtaa reseptorin ionikanavan avautumiseen, natriumin virtaamiseen lihakseen ja lihaksen depolarisoitumiseen (Martyn ym. 2009). Depolarisaatio leviää lihaksen natriumkanavien avautumisen myötä ja johtaa lopulta lihaksen supistumiseen. Hermostollisten nikotiinireseptorien aktivaatio voi johtaa niin ikään natriumin sisäänvirtaukseen ja solukalvon nopeaan depolarisaatioon, mutta tärkeämpänä pidetään kalsiumin sisäänvirtausta sekä suoraan nikotiinireseptorien kautta että jännite-riippuvaisten kalsiumkanavien aktivoitumisen johdosta (Dajas-Bailador ja Wonnacott 2004; Dani ja Bertrand 2007; Albuquerque ym. 2009). Reseptorin alayksikkökoostumus vaikuttaa sen kalsiumläpäisevyyteen, ja homomeerisia  $\alpha 7$ -reseptoreita pidetään parhaiten kalsiumia läpäisevänä nikotiinireseptorityyppinä (Fucile ym. 2003). Samanaikaisesti kalsiumin sisäänvirtauksen kanssa kalsiumia voi vapautua myös solunsisäisistä kalsiumvarastoista, mitä pidetään erityisen tärkeänä ilmiönä pitkäkestoisten nikotiinireseptorivälitteisten kalsiumsignaalien muodostumisessa (Dajas-Bailador ja Wonnacott 2004). Hermostollisten nikotiinireseptorien stimulaation on osoitettu aktivoivan useita kalsiumriippuvaisia solunsisäisiä kinaaseja ja näistä alavirtaan sijaitsevia transkriptiotekijöitä (Albuquerque ym. 2009). Nikotiinireseptorien aktivaation aiheuttamien solunsisäisen kalsiumsignaalien muutosten uskotaan olevan yhteydessä mm. välittäjäaineiden vapautumiseen, geeniekspressioon, hermoston muovautuvuuteen, palkitsemis- ja riippuvuuskäyttäytymiseen, neuroprotektioon ja solukuoleman säätelyyn (Dajas-Bailador ja Wonnacott 2004).

Nikotiinireseptorien toiminnan kannalta keskeinen ominaisuus on niiden alttius epäherkistymiselle ionikanavan avautumisen jälkeen tai joskus jopa ilman kanavan avautumista (Quick ja Lester 2002; Changeux ja Edelstein 2005; Picciotto ym. 2008). Epäherkistyneet reseptorit eivät voi aktivoitua, mutta tästä huolimatta niiden affiniteetti ligandehinsa on jopa aktiivista tilaa suurempi. Reseptorityypeistä  $\alpha 7$ -reseptoreita pidetään erityisen herkästi ja nopeasti epäherkistyvinä, kun taas  $\beta 2$ - tai  $\beta 4$ -alayksiköitä sisältävät reseptorit ovat suhteessa vähemmän herkästi ja hitaammin epäherkistyviä ja palautuvat nopeammin aktiiviseen tilaan. Samanaikaista eri reseptorityyppien

aktivoitumista ja epäherkistymistä on esitetty selitykseksi esimerkiksi sille, että nikotiiniagonistit ja -antagonistit voivat aiheuttaa samanlaisia vasteita esimerkiksi mitattaessa välittäjäaineiden vapautumista aivoleikkeistä (Picciotto ym. 2008).

Epäherkistymisen lisäksi nikotiinireseptoreille tyypillinen ilmiö on niiden ilmentymisen lisääntyminen (upregulation) kroonisen nikotiinialtistuksen yhteydessä mitattuna radioleimatus nikotiinin sitoutumiskokein (Picciotto ym. 2008; Albuquerque ym. 2009).  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien tapauksessa ilmiö on selvästi havaittava, mutta muiden reseptorityyppien tapauksessa vähemmän selkeä. Esimerkiksi  $\alpha 6^*$ -reseptorien ilmentymisen on havaittu sekä lisääntyvän, vähentyvän että pysyvän ennallaan kroonisen nikotiinialtistuksen jälkeen (Picciotto ym. 2008). Ilmentymisen lisääntymisen mekanismit ovat moninaiset ja epäselvät, mutta ilmeisesti luonteeltaan DNA:n transkription jälkeiset (Marks ym. 1992). Epäselvää on myös, missä määrin lisääntynyt nikotiinin sitoutuminen heijastaa toiminnallisten reseptorien määrän lisääntymistä ja missä määrin epäherkistyneiden reseptorien määrän lisääntymistä (Picciotto ym. 2008).

Hermostolliset  $\alpha 7$ -tyypin nikotiinireseptorit tunnistavat agonistina paitsi asetyylikoliinin myös sen metaboliitin koliinin (Albuquerque ym. 2009), ja koliinia onkin hyödynnetty tutkimuksessa selektiivisenä  $\alpha 7$ -agonistina. Tämän lisäksi on löydetty ja kehitetty paljon muitakin nikotiinireseptoreihin sitoutuvia agonisteja, kilpailevia ja ei-kilpailevia antagonisteja sekä allosteerisia säätelijöitä. Allosteerisiksi säätelijöiksi kutsutaan yhdisteitä, jotka vaikuttavat reseptorin toimintaan sitoutumalla muualle kuin asetyylikoliinin sitoutumiskohtaan tai ionikanavan luumeniin (Albuquerque ym. 2009; Taly ym. 2009). Allosteerisille säätelijöille tyypillistä on vähäinen oma aktiivisuus mutta kyky selektiivisesti tehostaa tai inhiboida reseptorin fysiologista aktiivisuutta. Myös endogeenisistä allosteerisistä säätelijöistä on todistusaineistoa (Albuquerque ym. 2009). Allosteeriset säätelijät ovat tärkeä yhdisteryhmä nikotiinireseptoreihin vaikuttavien lääkkeiden tutkimuksessa, ja mahdollisia allosteerisia sitoutumiskohtia tunnetaan runsaasti. Mekanismit, joilla allosteeriset säätelijät muuttavat esimerkiksi nikotiinireseptorien herkkyyttä agonistien vaikutuksille, ovat kuitenkin toistaiseksi epäselvät (Taly ym. 2009). Lisäksi on todistusaineistoa siitä, että nikotiinireseptoreita voivat aktivoida tai inhiboida niihin sitoutumalla myös jotkin pääasiassa täysin muihin

välittäjäainejärjestelmiin vaikuttavat yhdisteet, kuten antipsykootit (Grinevich ym. 2009) ja opioidit (Talka ym. 2013).

### 2.2.3. Nikotiinireseptorien merkitys hermoston toiminnassa ja sairauksissa

Nikotiinireseptorien toiminnallinen merkitys riippuu muun muassa reseptorin sijainnista hermosolussa. Hermoston nikotiinireseptorit voidaan jaotella niiden sijainnin perusteella somatodendriittisiin eli hermosolun soomaosassa tai dendriteissä sijaitseviin, aksonaalisiin eli myelinoidussa aksonissa sijaitseviin, preterminaalisiin eli aksonissa lähellä hermopäätettä sijaitseviin ja presynaptisiin eli hermopäätteessä sijaitseviin reseptoreihin (Dani ja Bertrand 2007; Albuquerque ym. 2009). Huomattavaa on, että keskushermoston kolinergiset hermosyyt eivät aina pääty synapseihin eivätkä nikotiinireseptorit aina sijaitse synapsien yhteydessä. Sen sijaan merkittävän osan nikotiinireseptoreita hyödyntävästä hermovälityksestä on esitetty olevan ei-synaptista hermovälitystä (non-synaptic transmission, volume transmission), jolla tarkoitetaan välittäjäaineen leviämistä diffuusion avulla vapautumispaikan ympäristöön, missä se voi aktivoida niin synaptisia kuin ei-synaptisiakin reseptoreita (Dani ja Bertrand 2007).

Somatodendriittisten nikotiinireseptorien pääasiallinen tehtävä on ääreishermoston nopeasta eksitatorisesta hermovälityksestä huolehtiminen hermo-lihasliitoksessa  $\alpha_1\beta_1\delta\gamma$ - ja  $\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$ -reseptorien välityksellä (Martyn ym. 2009) sekä autonomisen hermoston ganglioissa heterogeenisen (pääasiassa  $\alpha_3\beta_4^*$ ) reseptoripopulaation välityksellä (Flores ym. 1996; Mao ym. 2006). Somatodendriittisiä nikotiinireseptoreita tiedetään kuitenkin sijaitsevan paikallisesti myös keskushermostossa esimerkiksi hippokampuksen hermosoluissa ja keskiaivojen dopaminergisissä hermosoluissa (Albuquerque ym. 2009). Aksonaalisia nikotiinireseptoreita puolestaan on havaittu ainakin talamokortikaalisissa aksoneissa, missä heteromeeriset nikotiinireseptorit säätelevät aksonien ärtyvyyttä (Kawai ym. 2007).

Preterminaaliset ja presynaptiset nikotiinireseptorit säätelevät välittäjäaineiden vapautumista, minkä uskotaan olevan nikotiinireseptorien pääasiallinen tehtävä keskushermostossa (Wonnacott 2008). Lisäksi myös hermo-lihasliitoksissa on havaittu

asetyylikoliinin vapautumista sääteleviä presynaptisia nikotiinireseptoreita (Faria ym. 2003). Preterminaaliset reseptorit sijaitsevat aksoneissa lähellä hermopäätteitä, ja niiden on esitetty jänniteriippuvaisia natriumkanavia aktivoimalla tehostavan pääasiassa aktiopotentiaaleista riippuvaa välittäjäaineen vapautumista (Léna ym. 1993; Dani ja Bertrand 2007; Albuquerque ym. 2009). Tästä johtuen preterminaalisten reseptorien vaikutus on herkkä jänniteriippuvaisia natriumkanavia salpaavalle tetrodotoksiinille. Sama pätee somatodendriittisiin ja aksonaalisiin reseptoreihin, joiden vaikutukset välittäjäaineiden vapautumiseen ovat niin ikään aktiopotentiaaleista riippuvia. Hermopäätteissä sijaitsevien ja keskushermoston yleisimpänä nikotiinireseptorityyppinä pidettyjen presynaptisten reseptorien välittäjäaineiden vapautumista stimuloiva tai tehostava vaikutus sen sijaan perustuu pääasiassa solunsisäisen kalsiumpitoisuuden kohoamiseen ja kalsiumvälitteisiin eksosytoosimekanismeihin (Dajas-Bailador ja Wonnacott 2004; Albuquerque ym. 2009). Näin ollen presynaptisten reseptorien vaikutus on luonteeltaan kalsiumriippuvainen, mutta yleensä ei herkkä tetrodotoksiinille (ks. kuitenkin 2.3.).

Nikotiinireseptorivälitteisen hermovälityksen heikentymisen, häiriintymisen tai muutosten yhteydestä moniin sairauksiin on paljon todistusaineistoa, ja nikotiinireseptorien ligandeja on pyritty kehittämään muun muassa Alzheimerin taudin, Parkinsonin taudin, tupakoinnin lopettamisen, masennuksen, neuropaattisen kivun ja hyperaktiivisuusoireyhtymien hoitoon (Taly ym. 2009). Alzheimerin taudille on tyypillistä kolinergisten hermosolujen tuhoutumisesta johtuva kolinergisen aktiivisuuden ja nikotiinireseptorien määrän romahtaminen erityisesti hippokampuksessa ja aivokuorella (Dani ja Bertrand 2007; Gotti ym. 2006; Albuquerque ym. 2009). Tämä johtaa välittäjäaineiden vapautumista ja synaptista muovautuvuutta säätelevien, muistitoimintojen kannalta keskeisten kolinergisten mekanismien häiriintymiseen ja osaltaan sairauden edetessä ilmaantuviin kognitiivisiin ongelmiin. Nikotiinireseptorien agonisteilla tiedetään olevan muistia tehostavia vaikutuksia, ja runsaasti nikotiinireseptoriligandeja onkin kehitteillä Alzheimerin taudin hoitoa varten (Taly ym. 2009). Todistusaineistoa on myös nikotiinin Parkinsonin taudilta suojaavasta vaikutuksesta (Albuquerque ym. 2009). Parkinsonin tauti johtuu liiketoimintojen säätelyyn osallistuvien mustatumakkeen dopaminergisten hermosolujen etenevästä



tuhoutumisesta, mutta sairauteen liittyy myös striataalisten nikotiinireseptorien määrän vähentyminen (Gotti ym. 2006). Striataalisen dopamiinin vapautumisen nikotiinireseptorivälitteisen säätelyn selektiivinen tehostaminen onkin ollut lääkekehityksen tavoitteena, mutta toistaiseksi tuloksetta (Taly ym. 2009). Lisäksi joidenkin idiopaattisten epilepsioiden taustalta on löydetty mutaatioita nikotiinireseptorien alayksiköitä koodaavissa geneissä (Dani ja Bertrand 2007).

Lopuksi on mainittava nikotiinin erittäin vahva riippuvuutta aiheuttava vaikutus. Sekä ihmiset (Benowitz 1996) että koe-eläimet (Clark 1969; Goldberg ym. 1981) itseannostelevat nikotiinia. Nikotiinin on myös todettu aiheuttavan koe-eläimissä ehdollistettua paikkahakuisuutta, mitä pidetään osoituksena yhdisteen palkitsevista vaikutuksista (Henningfield ja Goldberg 1983; Fudala ym. 1985; Le Foll ja Goldberg 2005). Poistogeenisiä hiiriä hyödyntäen on havaittu viitteitä sekä  $\beta 2^*$ - että  $\alpha 7$ -reseptorityyppien osallistumisesta riippuvuuden syntymiseen (Walters ym. 2006; Besson ym. 2012). Pitkään jatkunut nikotiiniriippuvuustutkimus on tuottanut laajan kirjallisuuden nikotiinin akuuteista ja kroonisista vaikutuksista nikotiinireseptoreihin sekä vaikutusten yhteydestä koe-eläinten käyttäytymiseen ja riippuvuuden neurokemiallisiin mekanismeihin kuten dopaminergisen hermovälityksen muutoksiin (Changeux 2010; Dani ja Balfour 2011).

#### 2.2.4. Reseptorityyppiselektiiviset nikotiiniligandit

Nikotiinireseptorien ja niiden alatyypin tutkimuksessa on käytetty runsaasti farmakologisia menetelmiä. Tässä kirjallisuuskatsauksessakin on esitelty lukuisia tutkimuksia, joissa tietyn ilmiön taustalla olevaa nikotiinireseptoripopulaatiota on pyritty karakterisoimaan erilaisin farmakologisin käsittelyin. Tämän johdosta muutama sana lienee paikallaan yleisimmin käytetyistä reseptorityyppiselektiivisyyttä osoittavista nikotiiniligandeista. Mainittakoon, että vaikkakin erilaisia nikotiiniligandeja tunnetaan paljon, on alayksikköselektiivisten yhdisteiden joukko suhteellisen rajallinen ja selektiivisyyden aste usein korkeintaan kohtalainen erityisesti tarkasteltaessa ligandin toiminnallisia vaikutuksia pelkän sitoutumisen lisäksi (Jensen ym. 2005).

Selkeästi selektiiviset nikotiinireseptorien agonistit ovat lähinnä  $\alpha 7$ -agonisteja (esim. koliini), useimpien heteromeeristen reseptorien alatyyppejä erottelevien agonistien ollessa selektiivisyydeltään korkeintaan kohtalaisia (Jensen ym. 2005). Myös antagonistien tapauksessa eniten selektiivisiä ovat  $\alpha 7$ -selektiiviset antagonistit, joista yleisimmin käytettyjä ovat *Bungarus multicinctus* -käärmeen myrky  $\alpha$ -bungarotoksiini, *Delphinium*-kasvien alkaloidi metyylylykakonitiini ja erilaiset *Conus*-merietanoiden konotoksiinit (Jensen ym. 2005). Metyylylykakonitiinin tapauksessa on huomattava, että nanomolaarisilla pitoisuuksilla yhdiste salpaa selektiivisesti  $\alpha 7$ -reseptoreita, mutta korkeammilla (mikromolaarisilla) pitoisuuksilla se salpaa myös heteromeerisiä reseptorityyppejä (Davies ym. 1999; Mogg ym. 2002; Jensen ym. 2005).

Pääasiassa heteromeerisiä nikotiinireseptoreita salpaavia yhdisteitä ovat muun muassa *Erythrina*-kasvimyrkky dihydro- $\beta$ -erytroidiini (DH $\beta$ E), joka salpaa jokseenkin selektiivisesti  $\alpha 4^*$ - ja  $\beta 2^*$ -alatyyppejä sisältäviä reseptoreita (Chavez-Noriega ym. 1997), sekä monet konotoksiinit. Konotoksiineista kenties eniten käytetty on  $\alpha$ -konotoksiini MII, joka salpaa selektiivisesti ja suurella affiniteetilla sekä  $\alpha 3\beta 2^*$ - että  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptorityyppejä (Cartier ym. 1996; Kuryatov ym. 2000; Champiaux ym. 2002). Muiden konotoksiinien joukosta tunnetaan muun muassa  $\alpha 3\beta 4^*$ - ja  $\alpha 3\beta 2^*$ -reseptoreita selektiivisesti salpaavia yhdisteitä (Jensen ym. 2005). Yleisesti käytetty mekamylamiini ja klassinen *Chondrodendron tomentosum* -köynnöksen nuoli-myrykkynäkin tunnettu d-tubokurariini sen sijaan eivät ole erityisen selektiivisiä minkään reseptorityypin suhteen (Jensen ym. 2005).

### 2.3. Nikotiinireseptorit ja välittäjäaineiden vapautumisen säätely

Keskushermoston nikotiinireseptorien pääasiallisena tehtävänä pidetään hermovälittäjä-aineiden vapautumisen säätelyä (McGehee ym. 1995; Wonnacott 1997; Dani ja Bertrand 2007). Nikotiinireseptorit säätelevät monien välittäjäaineiden vapautumista monilla (ellei kaikilla) aivoalueilla. Säätely hyödyntää sekä synaptista että ei-synaptista kolinergista hermovälitystä ja välittyy valtaosin presynaptisten nikotiinireseptorien kautta. Kirjallisuuskatsauksen loppuosan tarkoituksena on käydä pääpiirteissään läpi kirjallisuus nikotiinireseptorien osuudesta dopamiinin, glutamaatin,  $\gamma$ -aminovoihapon

(GABA), asetyylikoliinin, noradrenaliinin ja serotoniinin vapautumisen säätelyssä valituilla aivoalueilla erityisesti presynaptisten nikotiinireseptorien rooliin keskittyen. Aivoalueista katsauksen pääkohteeksi on valittu striatum eli aivojuovio (sisältäen sekä dorsaalisen että ventraalisen striatumin) ja ensisijaisesti dopamiinin vapautumisen säätely striatumissa, joka on ollut selvästi laajimman tieteellisen mielenkiinnon kohteena. Muut käsitellyt aivoalueet ovat muistin ja oppimisen kannalta kriittinen hippokampus sekä muun muassa toiminnanohjaukseen osallistuva prefrontaalinen aivokuori.

Kirjallisuuskatsauksen loppuosassa tarkastellaan lukuisia eri menetelmin tehtyjä tutkimuksia, mistä syystä on välttämätöntä esitellä lyhyesti tärkeimmät käytetyt menetelmät. Eri nikotiinireseptorityyppien esiintymistä keskushermoston eri alueilla voidaan tutkia *in vitro* muun muassa mittaamalla kudospäätteistä nikotiinireseptorien eri alayksiköiden mRNA:ta. Tähän on sovellettu *in situ* -hybridisaatiota, joka perustuu leimatun komplementaarisen nukleotidiketjun käyttöön (Wilcox 1993; Levsky ja Singer 2003), sekä käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktiota (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), joka perustuu entsyymattiseen mRNA:n monistamiseen (VanGuilder ym. 2008). Myös erilaisin immunokemiallisin menetelmin (Burns 2005) voidaan mitata tietyn alayksikön tai reseptorityypin ilmentymistä hyödyntäen esimerkiksi leimattuja proteiinispesifisiä vasta-aineita tai immunosaostusta. Radioleimattujen nikotiiniligandien sitoutumiskokeilla, joissa reseptoriin sitoutunut ligandi havaitaan radioaktiivisuuden perusteella, on puolestaan mahdollista tutkia esimerkiksi reseptorien farmakologisia ominaisuuksia, sitoutumisen kinetiikkaa tai reseptorien sijaintia hermostossa (Lukas ym. 2001).

Välittäjäaineiden vapautumista on tutkittu *in vivo* erityisesti kallonsisäisellä mikrodialyysillä mutta myös käyttäen kallonsisäisiä mikroelektrodeja (Perry ym. 2009). Lisäksi nikotiinireseptorien osallistumista hermovälitykseen ja erityisesti välittäjäaineiden vapautumisen säätelyyn on tutkittu hyvin paljon *in vitro* käyttäen aivoleikkeitä (Lynch ja Schubert 1980; Cuello 1983) ja synaptosomeja (Whittaker ym. 1964; Raiteri ja Raiteri 2000). Aivoleikkeet ovat eristettyjä muusta hermostosta mutta sisältävät usein toimintakykyisiä hermopäätteitä ja aksoneita, hermosoluja ja jopa

hermoverkon osia. Tämä mahdollistaa muun muassa eri hermosolujen ja välittäjäaineiden yhteistoiminnan tutkimisen, mutta esimerkiksi reseptorien sijaintia soluissa tai yksittäisen reseptorityypin osuutta havaituissa vaikutuksissa on usein vaikea selvittää ilman monimutkaisia koejärjestelyjä tai farmakologisia käsittelyjä. Välittäjäaineiden vapautumisen säätelyä aivoleikkeissä on tutkittu esimerkiksi mittaamalla radioleimatus välittäjäaineen vapautumista perfusoiduista tai inkuboiduista aivoleikkeistä, mittaamalla vapautuvaa välittäjäainetta elektrokemiallisesti voltammetrialla ja mittaamalla elektrofysiologisesti hermosolujen sähköistä toimintaa ja sen muutoksia. Erilaiset synaptosomiperfuusiomenetelmät puolestaan soveltuvat erinomaisesti presynaptisten reseptorien tutkimiseen. Eristettyjen mutta toimintakykyisten hermopäätteiden tutkiminen jatkuvissa perfuusio-olosuhteissa auttaa muun muassa mahdollisten epäsuorien vaikutusten poissulkemisessa (Raiteri ja Raiteri 2000; Wonnacott ym. 2000). Synaptosomien katsotaan yleisesti sisältävän merkittävässä määrin vain presynaptisia reseptoreita. Joissain synaptosomitutkimuksissa on tosin havaittu myös tetrodotoksiinille herkkiä nikotiinireseptorivälitteisiä vaikutuksia (Marks ym. 1995; Soliakov ym. 1995; Marshall ym. 1996; myös useat myöhemmin esiteltävät tutkimukset). Tämän voi katsoa viittaavan siihen, että synaptosomit voivat joissain tapauksissa sisältää myös lähellä hermopäätettä sijaitsevia toimintakykyisiä preterminaalisia reseptoreita. Vaihtoehtoisesti osa keskushermoston presynaptisista nikotiinireseptoreista saattaa toimia mekanismilla, joka on paitsi kalsiumriippuvainen myös vaatii jänniteriippuvaisten natriumkanavien aktivaation. Tarkka rajanveto presynaptisten ja preterminaalisten reseptorien välillä riippunee osittain määrittelijästä ja on monesti vaikeaa tutkimustuloksia tulkittaessa.

### 2.3.1. Striatum

#### 2.3.1.1. Striatumin rakenne ja nikotiinireseptorit

Striatum eli aivojuovio on suurikokoinen subkortikaalinen rakenne, joka toimii etuaivojen tyvitumakkeiden pääasiallisena informaatiota vastaanottavana tumakkeena (Björklund ja Dunnett 2007; Exley ja Cragg 2008). Striatum jaetaan tyypillisesti kahteen osaan. Sensorimotorista informaatiota käsittelevä dorsaalinen striatum

muodostuu pääasiassa häntätumakkeesta (nucleus caudatus) ja aivokuorukasta (putamen), ja limbistä informaatiota käsittelevä ventraalinen striatum muodostuu pääasiassa accumbens-tumakkeesta, joskin jaottelun ajantasaisuus on myös kyseenalaistettu (Voorn ym. 2004). Huomautettakoon, että usein kirjallisuudessa ei ole määritelty, tarkoitetaanko käsitteellä ”striatum” sekä dorsaalista että ventraalista striatumia vai, kuten myös on usein tapana, pelkästään dorsaalista striatumia. Tässä katsauksessa dorsaalinen ja ventraalinen striatum on pyritty mahdollisuuksien mukaan erittelemään tutkimustuloksia esitellessä. Käsitettä striatum on kuitenkin käytetty, mikäli lähteessä ei ole tarkemmin määritelty tutkittavaa aivoaluetta, eikä asia ole myöskään selkeästi pääteltävissä.

Striatumin hermosoluista valtaosa (noin 95 %) on nimellä medium spiny neuron (MSN) tunnettuja projektihermosoluja, jotka lähettävät inhiboivia GABAergisiä projektioita muihin tyvitumakkeiden osiin kahden erillisen hermoradan kautta (Smith ja Bolam 1990; Björklund ja Dunnett 2007; Benarroch 2012; Gittis ja Kreitzer 2012). Loput hermosolut koostuvat kolinergisistä interneuroneista ja kolmen tyypin GABAergisistä interneuroneista. Striatumiin johtavista hermoradoista luultavimmin eniten tutkittuja ovat keskiaivojen mustatumakkeen (substantia nigra) ja ventraalisen tegmentumin (ventral tegmental area) dopaminergisten hermosolujen erittäin tiheet striatumin MSN-soluja hermottavat projektiot (Björklund ja Dunnett 2007). Kyseiset hermoradat jaetaan yleisesti mustatumakkeesta dorsaaliseen striatumiin kulkevaan nigrostriataaliseen hermorataan ja ventraalisesta tegmentumista ventraaliseen striatumiin kulkevaan mesolimbiseen hermorataan, joskin jaottelu on yksinkertaistava ja myös risteäviä projektioita esiintyy pienessä määrin. Nigrostriataalinen hermorata, jonka tuhoutuminen on Parkinsonin taudin oireiden ensisijainen syy, on tärkeässä tehtävässä muun muassa motorisen toiminnan koordinaatiossa, liiketoimintojen oppimisessa sekä toimintojen valitsemisessa ja aloittamisessa (Iversen ja Iversen 2007; Iversen ym. 2009). Mesolimbistä hermorataa ja ventraalista striatumia on puolestaan pitkään pidetty muun muassa motivaation, ehdollistumisen ja riippuvuuden kannalta tärkeinä rakenteina. Uudempien hypoteesien mukaan accumbens-tumake ja erityisesti sen ydin käsittelee informaatiota muun muassa tapahtumien tärkeydestä (saliency) sekä palkitsevista tai

aversiivisista ärsykkeistä ja niiden ennustettavuudesta (Iversen ja Iversen 2007; Iversen ym. 2009).

Dopaminergisten hermoratojen lisäksi striatumin MSN-soluja hermottavat tiheästi myös aivokuoren ja talamuksen glutamatergisten solujen projektiot, joiden synapsit sijaitsevat usein dopaminergisten synapsien läheisyydessä (Smith ja Bolam 1990; Doig ym. 2010; Benarroch 2012). Muita striatumin alueelle saapuvia hermoratoja ovat keskiaivojen dorsaalisen raphen tumakkeen serotonergisten hermosolujen projektiot, joiden vapauttama serotoniini osallistuu dopaminergisen hermovälityksen säätelyyn toistaiseksi epäselvällä mekanismilla (Navailles ja De Deurwaerdère 2011), sekä aivorungon noradrenergisten hermosolujen projektiot (Meitzen ym. 2011). Striatumin hermovälityksen säätelyyn osallistuvat myös interneuronien vapauttama GABA ja muista välittäjäaineista ainakin adenosini sekä endogeeniset opioidit ja kannabinoidit (Zhang ja Sulzer 2012). Lisäksi kolinergisten interneuronien vapauttamalla asetyylikoliinilla on kriittinen merkitys sekä MSN-hermosolujen suorana säätelijänä muskariinireseptorien kautta että muiden välittäjäaineiden vapautumisen säätelijänä nikotiinireseptorien välityksellä (Exley ja Cragg 2008; Benarroch 2012). Kolinergisten interneuronien vähäisestä määrästä huolimatta ne ovat runsaasti haarautuneita ja hermottavat laajalti ja osittain ei-synaptisesti koko striatumin aluetta.

Striatumin alueella ilmentyy runsaasti erilaisia nikotiinireseptoreita. mRNA:n esiintymistä mittaavissa *in situ* -hybridisaatio- ja RT-PCR-tutkimuksissa jyrkijän mustatumakkeen ja ventraalisen tegmentumin dopaminergisten hermosolujen on havaittu ilmentävän vaihtelevassa määrin kaikkia nisäkkään aivoissa ilmentyviä nikotiinireseptorialayksiköitä ( $\alpha 2$ – $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ – $\beta 4$ ; Marks ym. 1992; Le Novère ym. 1996; Klink ym. 2001; Azam ym. 2002), joskaan kaikkien alayksiköiden ilmentyminen striatumin terminaalialueilla ei tämän perusteella ole varmaa. Immunosauostuskokeita, reseptorisitoutumiskokeita ja poistogeenisiä hiiriä hyödyntäen on kuitenkin saatu todisteita ainakin  $\alpha 4\beta 2$ -,  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ -,  $\alpha 6\beta 2$ -,  $\alpha 6\beta 2\beta 3$ -,  $\alpha 4\alpha 6\beta 2$ -, ja  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ -reseptorien esiintymisestä hiiren (Champtiaux ym. 2003; Gotti ym. 2005; Brown ym. 2007) ja rotan (Zoli ym. 2002; Gotti ym. 2010) striatumin alueella.

Tutkimuksissa, joissa on mitattu radioleimatun  $\alpha 3\beta 2^*/\alpha 6\beta 2^*$ -selektiivisen  $\alpha$ -konotoksiini MII:n sitoutumista poistogeenisten hiirten striatum-näytteisiin, on saatu lisää edeltävää tukevia tuloksia.  $\alpha 6$ -alaysikön poistaminen hävitti dorsaalisen ja ventraalisen striatumin  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkät sitoutumispaikat (Champtiaux ym. 2002), mutta  $\alpha 3$ -alaysikön poistolla ei ollut vaikutusta näiden alueiden  $\alpha$ -konotoksiini MII-sitoutumiseen (Whiteaker ym. 2002), minkä perusteella hiiren striatumin voi päätellä ilmentävän  $\alpha 6\beta 2^*$ - mutta ei  $\alpha 3\beta 2^*$ -reseptoreita. Salminen ym. (2005) puolestaan havaitsivat niin ikään poistogeenisiä hiiriä tutkiessaan striatumin  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkkien  $\alpha 6\beta 2^*$ -tyypin reseptorien voivan sisältää myös  $\alpha 4$ - ja  $\beta 3$ -alaysiköitä mutta ei  $\alpha 5$ -,  $\alpha 7$ - tai  $\beta 4$ -alaysiköitä. Lisäksi hiirelle dopamiinihermotoksiini MPTP:llä aiheutettuja dopaminergisia leesioita hyödyntäen on havaittu vahva korrelaatio dopamiinihermosolujen tuhoutumisen ja  $\alpha$ -konotoksiini MII -sitoutumisen välillä viitaten siihen, että  $\alpha 6\beta 2^*$ -tyypin reseptorit sijaitsevat lähes yksinomaisesti dopaminergisissä hermopäätteissä (Quik ym. 2003). Lopulta todettakoon jyrsijän striatumissa esiintyvän myös  $\alpha 7$ -reseptoreita ainakin glutamatergisissä hermopäätteissä (ks. 2.3.1.3.). *In situ* -hybridisaatiotutkimuksissa rotan striataalisilta alueilta ei havaittu ainakaan suurissa määrin  $\alpha 7$ -alaysikön mRNA:ta (Séguéla ym. 1993), mutta hiiren dorsaalista ja ventraalisesta striatumista kyettiin havaitsemaan  $\alpha 7$ -mRNA:ta (Cui ym. 2003).

Valtaosa striatumin nikotiinireseptoreita koskevasta tutkimuksesta on tehty jyrsijöillä. Apinan striatumilla suoritetuilla immunosaostus- ja sitoutumiskokella on saatu viitteitä osittain samojen ( $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 6\beta 2\beta 3$ ,  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ ,  $\alpha 7$ ) mutta myös vain kädellisille tyypillisten ( $\alpha 2\beta 2^*$ ,  $\alpha 2\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2^*$ ) nikotiinireseptorien ilmentymisestä (Quik ym. 2005). MPTP-leesioita hyödyntäen todettiin näistä  $\alpha 2\beta 2^*$ - ja  $\alpha 7$ -reseptorien sijaitsevan muualla kuin dopaminergisissä hermopäätteissä. Huomattavaa eroissa jyrsijän ja kädellisen välillä on muun muassa  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkkien  $\alpha 3\beta 2^*$ -reseptorien esiintyminen vain kädellisen striatumissa. Lopuksi myös ihmisen striataalisista kudoksenäytteistä on havaittu immunosaostus- ja sitoutumiskokein  $\alpha 3$ -,  $\alpha 4$ -,  $\alpha 6$ -,  $\beta 2$ -, ja  $\beta 3$ -alaysiköitä, muiden alaysiköiden jäädessä alle havaitsemisrajan (Gotti ym. 2006).

### 2.3.1.2. Dopamiinin vapautuminen striatumissa

Keskiaivojen dopaminergiset hermoradat vapauttavat striatumissa dopamiinia, joka säätelee MSN-projektiohermosolujen aktiivisuutta (Gittis ja Kreitzer 2012). Striatumin dopaminergisten hermopäätteiden nikotiinireseptorit ovat selvästi eniten tutkittu välittäjäaineiden vapautumista säätelevien nikotiinireseptorien joukko. Ensimmäisiä todisteita nikotiinireseptorien roolista striataalisessa dopamiinin vapautumisesta olivat havainnot nikotiinin kyvystä aiheuttaa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista rotan dorsaalista striatumista ja accumbens-tumakkeesta valmistetuista perfusoiduista aivoleikkeistä (Westfall 1974; Giorguieff-Chesselet ym. 1979; Rowell ym. 1987) sekä rotan (Sakurai ym. 1982; Rapier ym. 1988) ja hiiren (Grady ym. 1992) striatumista valmistetuista perfusoiduista synaptosomeista. Lisäksi nikotiinin havaittiin lisäävän dopamiinin vapautumista myös rotan dorsaalissa striatumissa ja accumbens-tumakkeessa *in vivo* -mikrodialyysillä mitattuna sekä systeemisen (Imperato ym. 1986; Di Chiara ja Imperato 1988b) että paikallisen (Toth ym. 1992; Marshall ym. 1997) annostelun jälkeen. Sitten nikotiiniagonistien aiheuttamaa dopamiinin vapautumista jyrkijän striataalisista synaptosomeista ja leikkeistä on tutkittu hyvin runsaasti, ja striataalista dopamiinivapautumista säätelevät presynaptiset nikotiinireseptorit on kyetty karakterisoimaan varsin perusteellisesti.

Grady ym. (1992; 1994; 1997) ensimmäiset tutkimukset osoittivat nikotiinin stimuloivan kalsiumriippuvaisesti [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista hiiren striataalisista synaptosomeista. Stimuloitu vapautuminen oli estettävissä nikotiiniantagonisteilla ja jaoteltavissa hetkelliseen ja pitkäkestoiseen vapautumiseen. Eri nikotiiniagonistien ja -antagonistien todettiin myös olevan jaoteltavissa ryhmiin niiden toiminnallisten vaikutusten ja sitoutumisaffiniteettien perusteella, mistä saatiin ensimmäiset viitteet useamman kuin yhden toiminnallisen nikotiinireseptoripopulaation osuudesta dopamiinin vapautumisesta. Vähintään kahteen reseptoripopulaatioon viittasi myös myöhemmin havaittu  $\alpha$ -konotoksiini MII:n aiheuttama osittainen (n. 50 %) dopamiinin vapautumisen estyminen hiiren dorsaalista ja ventraalisesta striatumista valmistetuista synaptosomeista (Grady ym. 2002)



Eri nikotiinireseptorityyppien osuutta nikotiiniagonistien stimuloimassa striataalisessa dopamiinin vapautumisessa on sittemmin selvitetty perusteellisesti hyödyntäen poistogeenisiä hiiriä.  $\beta 2$ -alaysikön geneettisen poistamisen havaittiin estävän kaiken dopamiinin vapautumisen sekä dorsaalista että ventraalisesta striatumista valmistetuista synaptosomeista, minkä voi katsoa osoittavan kaiken vapautumisen välittyvän  $\beta 2$ -alaysikön sisältävien reseptorien kautta (Whiteaker ym. 2000; Grady ym. 2002). Champtiaux ym. (2003) havaitsivat puolestaan  $\alpha 4$ - tai  $\alpha 6$ -alaysikön poistamisen estävän puolet nikotiinin stimuloimasta dopamiinin vapautumisesta hiiren koko striatumista valmistetuista synaptosomeista ja  $\alpha 4\alpha 6$ - tai  $\beta 2$ -poistamisen hävittävän vapautumisen kokonaan. Lisäksi sekä dorsaalista että ventraalisesta striatumista valmistetuissa synaptosomeissa  $\alpha$ -konotoksiini MII esti kaiken dopamiinivapautumisen  $\alpha 4$ -poistogeenisissä hiirissä muttei vaikuttanut lainkaan  $\alpha 6$ -poistogeenisissä hiirissä. Tuloksista voidaan päätellä  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkän vapautumisen välittyvän  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptorien kautta ja  $\alpha 4\beta 2^*$ - ja  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptorien olevan osapuulleen yhtä suuressa roolissa dopamiinin totaalivapautumisessa. Cui ym. (2003) osaltaan totesivat  $\beta 3$ -alaysikön poistamisen hävittävän lähes kaiken  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkän dopamiinin vapautumisen hiiren striataalisista synaptosomeista, viitaten  $\beta 3$ -alaysikön olevan tärkeässä roolissa  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkän vapautumisen välittymisessä.

Kenties laajimmat poistogeenisiä hiiriä hyödyntäneet tutkimukset striataalisten dopamiinihermopäätteiden nikotiinireseptorityyppien karakterisoimiseksi ovat Salmisen ym. (2004; 2007) synaptosomitutkimukset.  $\alpha 4$ - tai  $\beta 2$ -alatyypin poistamisen todettiin hävittävän kaiken  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentin dopamiinin vapautumisen,  $\alpha 5$ -alatyypin poistamisen vähentävän sen alle puoleen ja  $\alpha 7$ - tai  $\beta 4$ -alaysiköiden poistamisen olevan vailla vaikutusta (Salminen ym. 2004).  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkkä vapautuminen (n. 30 % kaikesta vapautumisesta) puolestaan hävisi täysin  $\beta 2$ -alaysikön poistamisen myötä,  $\alpha 4$ - tai  $\beta 3$ -poistaminen hävitti siitä yli puolet, eikä  $\alpha 7$ - tai  $\beta 4$ -poistolla ollut vaikutusta. Tulosten perusteella kirjoittajat päättelivät  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentin vapautumisen välittyvän  $\alpha 4\beta 2$ - ja  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ -reseptorien kautta ja  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkän vapautumisen taustalla olevan pääasiassa  $\alpha 6\beta 2\beta 3$ - ja  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ -reseptoreita mutta vähäisessä määrin myös  $\alpha 6\beta 2$ - ja  $\alpha 4\alpha 6\beta 2$ -reseptoreita. Lisäksi  $\alpha 4$ - ja  $\alpha 4\beta 3$ -poistogeenisiä hiiriä tutkineissa kokeissa  $\alpha 4$ -poistaminen lisäsi  $\alpha$ -

konotoksiini MII -herkkään dopamiinin vapautumiseen tarvittavia nikotiinipitoisuuksia sekä dorsaalista striatumista että accumbens-tumakkeesta valmistetuissa synaptosomeissa, ja  $\alpha 4\beta 3$ -tuplaloisto lisäsi tarvittavia nikotiinipitoisuuksia entisestään (Salminen ym. 2007). Tulosten katsottiin varmistavan useiden  $\alpha 6^*$ -reseptorityyppien roolin dopamiinin vapautumisen säätelyssä, minkä lisäksi todettiin  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ -reseptorin olevan nikotiinin vaikutukselle herkin tunnettu reseptorityyppi. Hiiren striataalisten synaptosomien dopamiinivapautumista ovat tutkineet edelleen muun muassa Grady ym. (2010; 2012).  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentin dopamiinivapautumisen todettiin välittyvän  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ -reseptorien ja sekä  $\alpha 4\beta 2$ -reseptorin korkean herkkyyden ( $\alpha 4_2\beta 2_3$ ) että matalan herkkyyden ( $\alpha 4_3\beta 2_2$ ) muotojen kautta (Grady ym. 2010). Lisäksi todettiin, että dopamiinin vapautumista säätelevien reseptorien alayksikkökoostumus vaikuttaa reseptorien herkkyyteen nikotiinin epäherkistäville vaikutuksille (Grady ym. 2012).

Synaptosomikokeiden perusteella voidaan todeta olevan näyttöä vähintään seitsemän eri presynaptisen nikotiinireseptorityypin osallistumisesta dopamiinin vapautumisen säätelyyn hiiren striatumin dopaminergisista hermopäätteistä: korkean ja matalan herkkyyden  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ ,  $\alpha 6\beta 2$ ,  $\alpha 6\beta 2\beta 3$ ,  $\alpha 4\alpha 6\beta 2$  ja  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ . Sen sijaan  $\alpha 7$ -reseptoreita ei näytä esiintyvän dopamiinihermopäätteissä havaittavia määriä, joskin mainittakoon Turnerin (2004) havainto nikotiinin  $\alpha 7$ -välitteisestä vaikutuksesta hiiren striataalisten synaptosomien kalsiumsignalointiin. Reseptorityyppien joukon voi myös todeta vastaavan huomattavan täsmällisesti immunosaostuskokeissa havaittuja alayksikköyhdistelmiä.

Merkittävä osa striatumin dopaminergisten hermopäätteiden nikotiinireseptoreihin liittyvästä tutkimustiedosta on siis kerätty tutkimalla hiiren striataalisia synaptosomeja. Nikotiini stimuloi [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautumista myös rotan striataalisista synaptosomeista, vajaa puolet vapautumisesta on  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkkää viitaten  $\alpha 3\beta 2^*$ - tai  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptorien osallistumiseen, ja loppuosa vapautumisesta välittynee  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien kautta (Rapier ym. 1988; Kulak ym. 1997; Sharples ym. 2000; Wonnacott ym. 2000).

Monet tutkimukset ovat hyödyntäneet myös aivoleikkeitä, joita käytettäessä on otettava huomioon leikkeen hermosolujen ja hermoverkkojen osittainen toimintakykyisyys ja sen mahdollistamat epäsuorat vaikutukset eri välittäjäainejärjestelmien kautta sekä hermosolujen soomaosissa tai aksoneissa sijaitsevien reseptorien mahdollinen osuus. Nikotiiniagonistien on havaittu stimuloivan [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista hiiren ja rotan perfusoiduista striataalisista aivoleikkeistä (Wonnacott ym. 2000; Scholze ym. 2007). Rotan striataalisten aivoleikkeiden ja synaptosomien suora vertailu on paljastanut perfusoiduista aivoleikkeistä nikotiiniagonistein stimuloitua dopamiinin vapautumisen johtuvan sekä suoraan dopaminergisten hermopäätteiden  $\beta_2^*$ -nikotiinireseptorien kautta välittyvästä dopamiinin vapautumisesta että epäsuorasti striatumin glutamatergisten hermopäätteiden  $\alpha_7$ -reseptorien aktivaatiosta, lisääntyneestä glutamaatin vapautumisesta ja dopaminergisten hermopäätteiden glutamaattireseptorien aktivoitumisesta (Kaiser ja Wonnacott 2000; Wonnacott ym. 2000; ks. myös 2.3.1.3.). Scholze ym. (2007) puolestaan totesivat tetrodotoksiinille resistentin eli aktiopotentiaaleista riippumattoman ja presynaptisten reseptorien kautta välittyvän komponentin muodostavan vain 10 % nikotiinin stimuloimasta [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisesta hiiren ja rotan perfusoiduista striataalisista leikkeistä. Tulosten katsottiin viittaavan preterminaalisten tai aksonaalisten  $\beta_2^*$ -nikotiinireseptorien olemassaoloon.

Striataalisissa aivoleikkeissä on myös mitattu syklistä voltammetrialla nikotiinireseptorien ligandien vaikutuksia sähköisesti stimuloituun dopamiinin vapautumiseen. Menetelmän avulla on mahdollista tutkia reaaliaikaisesti aktiopotentiaaleista riippuvaa eli dopamiinihermosolun fysiologista aktiivisuutta muistuttavaa dopamiinin vapautumista ja sen presynaptista säätelyä. Poiketen perfuusio- ja mikrodialyysitutkimusten tuloksista, sekä nikotiinilla että nikotiiniantagonisteilla todettiin sekä spontaania että sähköisesti stimuloitua dopamiinin vapautumista vähentävä vaikutus hiiren striataalisissa leikkeissä (Zhou ym. 2001). Vapautumista vähentävän nikotiinin vaikutuksen tulkittiin johtuvan dopamiinin vapautumista säätelevien nikotiinireseptorien epäherkistymisestä, jonka myötä striataalisista interneuroneista vapautuvan endogeenisen asetyylikoliinin dopamiinin vapautumista stimuloivat vaikutukset estyvät. Menetelmän luonteesta johtuen farmakologiset käsittelyt ovatkin tyypillisesti

pitkäkestoisempia kuin perfuusiomenetelmissä. Kiintoisasti  $\beta_2$ -alayksikön geneettinen poistaminen hävitti paitsi nikotiiniagonistien ja -antagonistien vaikutuksen myös lähes kaiken sähköisesti stimuloitun dopamiinin vapautumisen. Tämä viittaa siihen, että dopaminergisten hermopäätteiden  $\beta_2^*$ -reseptorien aktivoituminen endogeenisen asetyylikoliinin toimesta on erittäin tärkeässä roolissa dopamiinin vapautumisen positiivisessa säätelyssä.

Myöhemmissä voltammetrisissa tutkimuksissa on todettu, että nikotiinin ja nikotiini-antagonistien vaikutus sähköisesti stimuloituu dopamiinin vapautumiseen vaihtelee riippuen dopamiinihermosolun aktiivisuustaajuudesta. Nikotiinireseptorien epäherkistyminen tai salpautuminen inhiboi voimakkaasti hermosolun toonista aktiivisuutta mallintavien yksittäisten tai matalan taajuuden sähköimpulssien stimuloimaa dopamiinin vapautumista, mutta inhiboi vähemmän tai jopa tehostaa hermosolun faasista eli purskeaktiivisuutta mallintavien korkean taajuuden sähköimpulssisarjojen aiheuttamaa vapautumista (Rice ja Cragg 2004; Zhang ja Sulzer 2004). Yhdistettynä havaintoihin kolinergisten interneuronien ja dopamiinihermosolujen synkronoidusta aktiivisuudesta on edellä mainittujen tulosten perusteella esitetty endogeenisen asetyylikoliinin aktivoimien presynaptisten nikotiinireseptorien toimivan dynaamisena striataalisen dopamiinin vapautumistodennäköisyyden ”suotimena” (Exley ja Cragg 2008). Asetyylikoliini tehostaa nikotiinireseptorien välityksellä erityisesti toonisen aktiivisuuden aiheuttamaa dopamiinin vapautumista. Tärkeät tai palkintoa ennustavat ärsykkeet sen sijaan johtavat tyypillisesti dopamiinihermosolujen purskeaktiivisuuteen mutta kolinergisten hermosolujen aktiivisuuden pysähtymiseen. Tämän aiheuttaman vähentyneen dopamiinihermopäätteiden nikotiinireseptorien aktivaation, samoin kuin nikotiinin epäherkistävän vaikutuksen, arvellaan johtavan dopaminergisten synapsien lisääntyneeseen herkkyyteen dopamiinihermosolun aktiivisuudelle ja korostuneeseen kontrastiin dopamiinihermosolun toonisen ja faasisen aktiivisuuden välillä. Edeltäviä tuloksia tukevat myös Zhangin ym. (2009) tutkimukset, joissa nikotiini vaimensi toonisen aktiivisuuden aiheuttamaa mutta tehosti purskeaktiivisuuden aiheuttamaa dopamiinin vapautumista dorsaalista striatumista ja accumbens-tumakkeen kuorikerroksesta valmistetuista rotan aivoleikkeistä. Lisäksi nikotiini lisäsi rotan dopamiinihermosolujen aktiopotentiaalitaajuutta ja erityisesti faasista aktiivisuutta *in*

*vivo* kallonsisäisillä elektrodeilla mitattuna. Kiintoisasti dorsaalisen striatumin dopamiinihermopäätteiden havaittiin olevan herkempiä vapauttamaan dopamiinia yksittäisen impulssin seurauksena, kun taas accumbens-tumakkeen kuorikerroksen havaittiin olevan huomattavasti herkempi purskeaktiivisuuden aiheuttamalle dopamiinin vapautumiselle.

Dorsaalisen ja ventraalisen striatumin eroja hiiren aivoleikkeissä ovat viime vuosina tutkineet syklisellä voltammetrialla Exley kolleegoineen (2008; 2012).  $\alpha$ -konotoksiini MII:n havaittiin muiden nikotiiniantagonistien tapaan inhiboivan yksittäisten ja matalan taajuuden sähköimpulssien stimuloimaa dopamiinin vapautumista mutta tehostavan korkean taajuuden impulssien stimuloimaa vapautumista (Exley ym. 2008). Vaikutus oli selkeä accumbens-tumakkeen ytimessä mutta vain vähäinen dorsaalisisessä striatumissa, viitaten  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptorien olevan tärkeämmässä roolissa accumbens-tumakkeessa. Poistogeenisillä hiirillä ja  $\alpha$ -konotoksiini MII:lla tehdyt kokeet paljastivat myöhemmin dorsaalisisessä striatumissa  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien ja erityisesti  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ -reseptorien olevan pääasiallisia dopamiinin vapautumista sääteleviä nikotiinireseptoreita, joskin myös  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptoreilla voi olla rooli joissain tilanteissa (Exley ym. 2012). Accumbens-tumakkeen ytimessä sen sijaan todettiin  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ -reseptorien säätelevän valtaosaa dopamiinin vapautumisesta. Tulokset ovat osittain poikkeavia aiemmista tutkimuksista, joissa on todettu  $\alpha$ -konotoksiini MII:n inhiboivan dopamiinin vapautumista yhtä suuressa määrin sekä dorsaalisisestä että ventraalisisestä striatumista valmistetuista perfusoiduista synaptosomeista (Grady ym. 2002; Champtiaux ym. 2003), mikä viittaisi  $\alpha 4(ei-\alpha 6)\beta 2^*$ - ja  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptorien olevan osapuilleen yhtä suuressa roolissa kummallakin alueella. Tulosten yksityiskohtien vertailussa on kuitenkin syytä noudattaa varovaisuutta toisistaan poikkeavien menetelmien johdosta. Leikkeiden vähemmän eristetty luonne voi tarkoittaa synaptosomeista kokonaan tai osittain puuttuvien reseptorien, kuten esimerkiksi preterminaalisten reseptorien, osallistumista havaittuihin vaikutuksiin.

Edellä on pyritty esittämään keskeisimpiä striatumin dopamiinivapautumisen paikallista nikotiinireseptorivälitteistä säätelyä koskevia tutkimustuloksia. Tutkimustulosten suuren määrän johdosta ei kuitenkaan ole kyetty antamaan kuin rajoitettu kuva aiheesta.

Lisäksi vaille tarkempaa huomiota on täytynyt jättää suuri joukko striataalista dopamiinivapautumista laajemmin koskevaa tutkimustietoa. Kuten mainittua, dopamiinin vapautumisen säätelyyn osallistuvat epäsuorasti myös striatumin glutamaattia vapauttavien hermopäätteiden presynaptiset nikotiinireseptorit. Lisäksi striatumin alueelta on todisteita myös asetyylikoliinin muskariinireseptorien sekä lukuisten muidenkin välittäjäaineiden eri reseptorityyppien (mukaan lukien dopamiinin autoreseptorien) osallistumisesta dopamiinin striataalisen vapautumisen presynaptiseen säätelyyn, säätelyn ollessa ainakin aivoleikkeissä pääasiassa inhiboivaa (Zhang ja Sulzer 2012). Samoin striatumin MSN-projektiohermosolujen aktiivisuutta säätelevät suoraan paitsi dopamiini myös asetyylikoliini muskariinireseptorien kautta sekä monet muut välittäjäaineet, joiden vapautumista nikotiinireseptorit voivat niin ikään säädellä (Livingstone ja Wonnacott 2009; Benarroch 2012). Striataalisten terminaali-alueiden nikotiinireseptorien ohella dopamiinin vapautumista säätelevät myös dopamiinihermosolujen mustatumakkeessa ja ventraalisessa tegmentumissa sijaitsevien soomaosien somatodendriittiset  $\alpha 4\beta 2^*$ -,  $\alpha 6\beta 2^*$ - ja  $\alpha 7$ -nikotiinireseptorit, joiden välittämää hermosolujen aktiivisuuden säätelyä pidetään kokonaisuudessaan pääasiallisena nikotiinin dopamiinin vapautumista lisäävänä vaikutusmekanismina (Maskos 2008; Gotti ym. 2010; Besson ym. 2012). Presynaptiset ja somatodendriittiset nikotiinireseptorit voivat myös säädellä muiden välittäjäaineiden kuten glutamaatin ja GABA:n vapautumista dopaminergisten hermoratojen lähtöalueilla ja sen myötä vaikuttaa epäsuorasti dopamiinihermosolujen aktiivisuuteen (Livingstone ja Wonnacott 2009). Kaiken kaikkiaan monet erilaiset, eri hermosoluissa ja aivoalueilla sijaitsevat nikotiinireseptorit osallistuvat siis striataalisen dopaminergisen aktiivisuuden säätelyyn monimutkaisissa hermoverkoissa, moninaisin mekanismein ja dynaamisessa yhteistyössä muiden välittäjäaineiden kanssa.

### 2.3.1.3. Glutamaatin vapautuminen striatumissa

Pääasiallinen striatumin MSN-soluja stimuloiva eksitatorinen signaali välittyy aivokuoren ja talamuksen glutamatergisten solujen hermopäätteistä vapautuvan glutamaatin kautta (Smith ja Bolam 1990; Doig ym. 2010). Paikallinen nikotiini-infuusio rotan striatumiin kohottaa glutamaatin solunulkoista pitoisuutta *in*

*vivo* -mikrodialyysillä mitattuna (Toth ym. 1992). Glutamaatin vapautumista säätelevien presynaptisten nikotiinireseptorien olemassaoloa olikin spekuloitu jo pitkään, ennen kuin Marchi ym. (2002) osoittivat nikotiiniagonistien tehostavan [<sup>3</sup>H]aspartaatin vapautumista (käytetään glutamaatin vapautumisen mittarina) rotan dorsaalista striatumista valmistetuista synaptosomeista kalsiumriippuvaisesti, joskin vain synaptosomien depolarisaation yhteydessä. Nikotiiniagonistien vaikutuksen estäminen  $\alpha 7$ -selektiivisillä antagonisteilla ( $\alpha$ -bungarotoksiini, metyyliyllykakoniini) viittasi  $\alpha 7$ -reseptorityypin keskeiseen rooliin. Lisätodisteita  $\alpha 7$ -reseptorien osuudesta glutamaatin vapautumisesta on saatu rotan *in vivo* -mikrodialyysillä: nikotiiniagonisti anatoksiini-a aiheutti paikallisesti striatumiin infusoituna striataalisten glutamaattitasojen kohoamisen, joka oli estettävissä metyyliyllykakoniinilla (Campos ym. 2010).

Glutamaattia ja dopamiinia vapauttavat hermopäätteet sijaitsevat striatumissa toistensa läheisyydessä mahdollistaen ristisignaloinnin välittäjäainejärjestelmien välillä, ja suuri osa tutkimuksesta onkin keskittynyt selvittämään nikotiiniagonistien epäsuoria glutamatergisten hermopäätteiden kautta välittyviä dopamiinin vapautumista lisääviä vaikutuksia. Kaiser ja Wonnacott (2000) havaitsivat  $\alpha 7$ -antagonistien ja ionotrooppisten glutamaattireseptorien antagonistien inhiboivan ei-additiivisesti anatoksiini-a:n stimuloimaa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista rotan perfusoiduista striataalisista leikkeistä. Tämän perusteella on esitetty presynaptisten  $\alpha 7$ -nikotiinireseptorien stimuloivan glutamaatin vapautumista ja tämän johtavan puolestaan dopamiinin vapautumiseen dopaminergisten hermopäätteiden presynaptisten glutamaattireseptorien välityksellä.

Edellä mainittua hypoteesia tukevat myös varhaisemmat havainnot ionotrooppisten glutamaattireseptorien agonistien kyvystä stimuloida [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista rotan striataalisista synaptosomeista (Wang 1991; Desce ym. 1992) sekä uudempi tutkimus, jossa ionotrooppisten glutamaattireseptorien antagonistit estivät valtaosan  $\alpha 7$ -agonistien aiheuttamasta [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisesta rotan striataalisista leikkeistä (Livingstone ym. 2009).  $\alpha 7$ -agonisti koliini stimuloi [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista myös hiiren striataalisista aivoleikkeistä, eikä vaikutusta havaittu  $\alpha 7$ -poistogeenisillä hiirillä (Quarta ym. 2009). Vaikkakaan glutamaattiantagonistien vaikutuksia ei tutkittu kyseisessä tutkimuksessa, vaikuttaa todennäköiseltä, että havaittu vaikutus välittyi

rottaa vastaavasti glutamaatin vapautumisen kautta, sillä presynaptiset  $\alpha 7$ -reseptorit eivät osallistu dopamiinin vapautumiseen hiiren striataalisista synaptosomeista (Salminen ym. 2004). Hiljattain on saatu myös suoria immunokemiallisia todisteita ionotrooppisten glutamaattireseptorien sijaitsemisesta rotan accumbens-tumakkeen dopamiinihermopäätteissä sekä lisää näyttöä niiden aktivaation stimuloimasta [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautumisesta synaptosomeista (Grilli ym. 2012). Kiintoisasti dopaminergisissa hermopäätteissä sijaitsevien nikotiinireseptorien aktivaation havaittiin voivan myös vaikuttaa samoissa hermopäätteissä esiintyvien glutamaattireseptorien toimintaan ja ilmentymiseen.

Kaiken kaikkiaan voidaan todeta olevan varsin hyvä näyttö siitä, että presynaptiset  $\alpha 7$ -nikotiinireseptorit säätelevät glutamaatin vapautumista striatumissa. Vapautunut glutamaatti todennäköisesti vuorostaan stimuloi dopamiinin vapautumista, joskin on myös todistusaineistoa, jonka mukaan ionotrooppisia glutamaattireseptoreita ei sijaitse dopaminergisissa hermopäätteissä vaan niiden aktivaatio vaikuttaa dopamiinin vapautumiseen epäsuorasti (Bernard ja Bolam 1998; Avshalumov ym. 2008; Zhang ja Sulzer 2012). Lisäksi sekä ionotrooppisten että metabotrooppisten glutamaattireseptorien aktivaation vaikutukset sähköisesti stimuloituun dopamiinin vapautumiseen striataalisissa aivoleikkeissä ovat tyypillisesti inhiboivia (Wu ym. 2000; Avshalumov ym. 2008; Zhang ja Sulzer 2012). Tulosten tulkintaa ja vertailua vaikeuttavat menetelmälliset erot ja eri välittäjäainejärjestelmien ilmeisen moninaiset interaktiot. Entisestään kuvaa sekoittavat tuoreet havainnot, joiden mukaan hiiren ja rotan mesolimbisen radan hermosolut voivat mahdollisesti lähettää accumbens-tumakkeeseen myös glutamaattia vapauttavia ja sekä dopamiinia että glutamaattia vapauttavia hermosyitä (Stuber ym. 2010; Tecuapetla ym. 2010; Yamaguchi ym. 2011). Toisaalta hiiren dorsaaliosassa striatumissa vastaavaa ilmiötä ei havaittu (Stuber ym. 2010), eivätkä Moss ym. (2011) kyenneet havaitsemaan rotan accumbens-tumakkeen dopaminergisista hermopäätteistä glutamaatin vapautumiseen tarvittavia proteiineja. Lisäksi tarkasteltaessa striatumin glutamaatti-dopamiini-interaktioita on tiedostettava, että myös dopamiini voi puolestaan säädellä glutamaatin vapautumista presynaptisten dopamiinireseptorien välityksellä (Bamford ym. 2004).



#### 2.3.1.4. GABA:n vapautuminen striatumissa

Striatumissa sijaitsevista hermosoluista valtaosan muodostavat GABAergiset MSN-projektiohermosolut, mutta pieni osa koostuu usean eri tyypin GABAergisistä interneuroneista (Gittis ja Kreitzer 2012). MSN-hermosolujen keskinäisten yhteyksien ja GABAergisten interneuronien muodostama inhibitorinen mikrohermoverkosto on keskeisessä osassa striatumista lähtevän hermovälityksen säätelyssä. Sekä presynaptisten että ei-presynaptisten nikotiinireseptorien roolista striataalisen GABA-vapautumisen säätelyssä on jonkin verran näyttöä.

Tutkiessaan [<sup>3</sup>H]GABA:n vapautumista hiiren eri aivoalueista valmistetuista perfusoiduista synaptosomeista Lu ym. (1998) totesivat nikotiinin stimuloivan GABA-vapautumista muun muassa striataalisista synaptosomeista. Tutkittaessa koko aivoista valmistettuja synaptosomeja vapautuminen oli estettävissä DHβE:llä mutta α-bungarotoksiinilla ei ollut vaikutusta, minkä lisäksi β<sub>2</sub>-alaysikön geneettinen poistaminen hävitti lähes kaiken vapautumisen, mistä pääteltiin β<sub>2</sub>\*-reseptorien olevan vaikutuksen taustalla. Osa vapautumisesta oli estettävissä myös tetrodotoksiinilla, minkä voi katsoa viittaavan sekä presynaptisten että mahdollisesti preterminaalisten nikotiinireseptorien osallistumiseen. Myöhemmin on poistogeenisiä hiirikantoja hyödyntäen todettu asetyylikoliinin stimuloiman [<sup>3</sup>H]GABA:n vapautumisen striataalisista synaptosomeista olevan kriittisesti riippuvaista α<sub>4</sub>- ja β<sub>2</sub>-alaysiköistä, α<sub>5</sub>-alaysikön poistamisen vähentävän vapautumista hieman ja α<sub>7</sub>- tai β<sub>4</sub>-alaysiköiden poistamisen jäävän vaikutuksetta (McClure-Begley ym. 2009). Tästä voi päätellä GABA:n vapautumista säätelevien presynaptisten nikotiinireseptorien olevan α<sub>4</sub>β<sub>2</sub>\*-reseptoreita, joista pieni osa on α<sub>4</sub>α<sub>5</sub>β<sub>2</sub>\*-reseptoreita. Lisäksi Grilli ym. (2009) totesivat hiiren dorsaalista striatumista valmistettuja synaptosomeja tutkiessaan muskariini-reseptoriagonistien vähentävän nikotiiniagonistien stimuloimaa [<sup>3</sup>H]GABA:n vapautumista, mikä viittaa siihen, että GABAergisissä hermopäätteissä sijaitsee myös inhiboivia muskariinireseptoreita.

Myös elektrofysiologiset tutkimukset rotan striataalisissa aivoleikkeissä ovat havainneet viitteitä sekä GABA:n vapautumista inhiboivista presynaptisista muskariinireseptoreista

että GABAergistä inhibitiota tehostavista ei- $\alpha 7$ -nikotiinireseptoreista, joskin havaitut nikotiinireseptorit todennäköisimmin sijaitsivat GABAergisissa interneuroneissa somatodendriittisesti eivätkä presynaptisesti (De Rover ym. 2002; Koós ja Tepper 2002). Lopuksi myös rotan striatumin *in vivo* -mikrodialyysillä mitatun solunulkoisen GABA-pitoisuuden on todettu kohoavan paikallisen anatoksiini-a-infuusion seurauksena ja metyyliylilykakonitiiniesikäsitteilyn estävän vain osan vaikutuksesta, mikä edelleen viittaa ei- $\alpha 7$ -reseptorien rooliin (Campos ym. 2010).

#### 2.3.1.5. Asetyylikoliinin vapautuminen striatumissa

Striatumin endogeenisen asetyylikoliinin lähde ovat kolinergiset interneuronit, joita on vain pieni osa striatumin hermosoluista mutta jotka muodostavat laajoja ja tiheästi haarautuneita aksoneita (Benarroch 2012). Interneuronit hermottavat MSN-projektiohermosoluja, joita vapautunut asetyylikoliini stimuloi muskariinireseptorien välityksellä. Interneuronien vapauttavan asetyylikoliinin merkitys on kuitenkin keskeinen myös muiden välittäjäaineiden vapautumisen säätelyssä sekä vapautumista inhiboivien muskariinireseptorien että vapautumista stimuloivien tai tehostavien nikotiinireseptorien välityksellä. Asetyylikoliinin vapautumisen nikotiinireseptori-välitteisestä itsesäätelystä sen sijaan ei muista tämän katsauksen käsittelemistä aivoalueista (ks. 2.3.2.5., 2.3.3.5.) poiketen ole näyttöä (Livingstone ja Wonnacott 2009), vaikka kolinergisten interneuronien onkin *in situ* -hybridisaatiotekniikalla havaittu ilmentävän ainakin  $\alpha 7$ - ja  $\beta 2$ -alalyksiköiden mRNA:ta (Azam ym. 2003). *In vivo* -mikrodialyysillä mitattuna systeemisesti annettu nikotiini ei aiheuttanut asetyylikoliinin vapautumista rotan striatumissa (Tani ym. 1998). Sen sijaan somatodendriittisten ja/tai aksonaalisten muskariinireseptorien on todettu inhiboivan asetyylikoliinin vapautumista kolinergisista interneuroneista ja näin epäsuorasti säätelevän myös nikotiinireseptorien aktivaatiota (Threlfell ym. 2010).

#### 2.3.1.6. Noradrenaliinin vapautuminen striatumissa

Aivorungon noradrenergisten solujen hermopäätteiden tiedetään vapauttavan noradrenaliinia sekä dorsaalissa että ventraalisessa striatumissa ja vaikuttavan siellä  $\alpha$ -

ja  $\beta$ -adrenergisten reseptorien välityksellä, mutta striataalisen noradrenaliinin fysiologinen merkitys on huomattavasti heikommin tunnettu kuin esimerkiksi dopamiinin (Meitzen ym. 2011). Myöskään noradrenaliinin vapautumisen mahdollisesta nikotiinireseptorivälitteisestä säätelystä striatumissa ei ole näyttöä, jälleen poiketen muista katsauksen käsittelemistä aivoalueista (ks. 2.3.2.6., 2.3.3.6.). Rotan striatumin solunulkoinen noradrenaliinipitoisuus ei kohonnut paikallisen nikotiini-infusion jälkeen *in vivo*-mikrodialyysillä mitattuna (Toth ym. 1992), mutta muita tutkimuksia aiheesta ei ilmeisesti ole tehty.

#### 2.3.1.7. Serotoniinin vapautuminen striatumissa

Keskiaivojen dorsaalisen raphen tumakkeen serotonergisten hermosolujen projektiot vapauttavat striatumissa serotoniinia, joka voi vaikuttaa dopamiinin vapautumiseen joko stimuloiden tai inhiboiden (Descarries ym. 1990; Navailles ja De Deurwaerdère 2011). Serotoniinireseptorien uskotaan todennäköisimmin sijaitsevan muualla kuin dopamiinihermopäätteissä (kuten interneuroneissa tai MSN-soluissa) ja vaikutusten olevan pääasiassa epäsuoria. Striataalisen serotoniinin vapautumisen nikotiinireseptorivälitteistä säätelyä on tutkittu vain vähän.

Serotonergisten hermoratojen leesion jälkeiset sitoutumiskokeet ovat osoittaneet nikotiinireseptoreita sijaitsevan striatumin serotonergisissa hermopäätteissä (Schwartz ym. 1984). Nikotiinin on myös havaittu stimuloivan [<sup>3</sup>H]serotoniinin vapautumista rotan perfusoiduista striataalisista aivoleikkeistä (Yu ja Wecker 1994). Samoin paikallisesti annosteltujen nikotiiniagonistien havaittiin lisäävän rotan accumbens-tumakkeen solunulkoista serotoniinipitoisuutta *in vivo* -mikrodialyysillä mitattuna (Ma ym. 2005). Ainoa suora näyttö striataalista serotoniinin vapautumista säätelevistä presynaptisista nikotiinireseptoreista lienee Reubenin ja Clarken (2000) tutkimus, jossa nikotiiniagonistit stimuloivat [<sup>3</sup>H]serotoniinin vapautumista rotan perfusoiduista striataalisista synaptosomeista. Stimuloitu vapautuminen oli vain vähän mutta tilastollisesti merkitsevästi vapautumisen perustasoa suurempaa ja estettävissä mekamyliamiinilla, metyyliylilykakonitiinilla ja DH $\beta$ E:llä muttei tetrodotoksiinilla. Tetrodotoksiinille resistentti synaptosomivapautuminen viittaa presynaptiseen

nikotiinireseptoripopulaatioon, joka antagonistien vaikutusprofiilin perusteella todennäköisesti koostuu pääasiassa  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptoreista  $\alpha 7$ -reseptorien roolin ollessa korkeintaan vähäinen. Lopuksi mainittakoon, että myös dorsaalissa raphen tumakkeessa sijaitsevilla serotonergisten hermosolujen soomaosissa on todettu esiintyvän solujen aktiivisuutta sääteleviä nikotiinireseptoreita, joiden on esitetty olevan sekä  $\alpha 7$ - että  $\alpha 4\beta 2^*$ -tyypin reseptoreita (Ma ym. 2005; Commons 2008; Galindo-Charles ym. 2008).

### 2.3.2. Hippokampus

#### 2.3.2.1. Hippokampuksen rakenne ja nikotiinireseptorit

Hippokampus eli aivoturso on aivokuoren ja keskiaivojen rajan limbisellä alueella sijaitseva aivokuoren ulkopinnan alle taittuva kortikaalinen rakenne, jonka uskotaan olevan kriittisessä osassa oppimisessa ja muistitoiminnoissa. Pääasiallisella hippokampuksella (hippocampus proper) tarkoitetaan useista eri solukerroksista koostuvaa, pyramidaalihermosoluja sisältävää ja alueisiin CA1–CA3 jaoteltua rakennetta, mutta hippokampukseen luetaan usein kuuluvaksi myös viereinen pykäläpoimu (dentate gyrus), minkä lisäksi voidaan puhua myös hippokampaalisesta muodostelmasta (hippocampal formation), joka sisältää edellisten lisäksi läheiset entorinaaliaivokuoren ja subiculumin alueet (Jarrard 1995; Klausberger ja Somogyi 2008). Hyvin laaja käyttäytymis- ja muita kokeita hyödyntänyt tutkimus on osoittanut muiden kortikaalisten ja subkortikaalisten aivoalueiden kanssa yhteistyössä toimivan hippokampuksen olevan kriittisessä roolissa erityisesti kontekstiriippuvaisten episodisten muistijälkien syntymisessä (Jarrard 1995; Wang ja Morris 2010). Hippokampus ja etenkin pääasiallisen hippokampuksen CA1-alue lienee myös yksi neurotieteen alan tutkituimmista aivoalueista, ja laaja tutkimus on pyrkinyt karakterisoimaan alueen hermosolupopulaatiota ja hermoverkkojen toimintaa muun muassa elektrofysiologisin menetelmin (Klausberger ja Somogyi 2008).

Hippokampuksen pyramidaalihermosolut ovat alueen pääasiallisia projektiolohkosoluja ja lähettävät glutamatergisia aksoneita muille aivokuoren alueille, subkortikaalisille

alueille ja myös hippokampuksen sisäisesti (Klausberger ja Somogyi 2008). Lisäksi hippokampuksessa esiintyy suuri joukko GABAergisiä interneuroneja, jotka säätelevät sekä pyramidaalisolujen että toisten interneuronien aktiivisuutta ja joita on pelkästään CA1-alueelta löydetty yli 20 erilaista (Klausberger ja Somogyi 2008; Griguoli ja Cherubini 2012). Pyramidaalisoluja ja interneuroneja puolestaan hermottavat sekä hippokampuksen että muiden aivoalueiden (manteliumake, entorinaaliaivokuori, talamus) glutamatergiset hermosolut. Striatumin tapaan myös hippokampus vastaanottaa dopaminergisiä projektioita mustatumakkeesta ja ventraalisesta tegmentumista, ja dopaminergisen hermovälityksen uskotaan osallistuvan synaptisen muovautuvuuden ja muistijälkien syntymisen säätelyyn (Jay 2003; Lisman ja Grace 2005). Hippokampusta hermottavat myös aivorungon locus coeruleuksen eli sinertävän aivotäplän noradrenergiset hermosolut (Foote ym. 1983) sekä keskiaivojen raphen tumakkeen serotonergiset hermosolut (Descarries ym. 1990).

Edellä mainittujen välittäjäaineiden lisäksi basaalisten etuaivojen kolinergisten hermosolujen hermopäätteet sekä pieni joukko kolinergisiä interneuroneja vapauttavat hippokampuksessa myös asetyylikoliinia, joka osallistuu hippokampaalisen hermovälityksen säätelyyn pääasiassa ei-synaptisesti sekä muskariini- että nikotiinireseptorien välityksellä (Dani ja Bertrand 2007; Griguoli ja Cherubini 2012). Asetyylikoliinin nikotiinireseptorien tärkeää roolia hippokampuksen toiminnassa heijastaa laaja tutkimuskirjallisuus nikotiinin vaikutuksista kognitiiviseen suoriutumiseen ja synaptiseen muovautuvuuteen (Levin ym. 2006; Mansvelder ym. 2006; Tang ja Dani 2009). Yleisesti ottaen nikotiiniagonistit voivat parantaa ja nikotiiniantagonistit heikentää kognitiivisissa tehtävissä suoriutumista. Todistusaineistoa tästä on saatu niin jyrsijöillä, kaloilla, apinoilla kuin ihmisilläkin. Vaikutukset riippuvat suuresti tehtävän luonteesta, oppimisen ja muistin hyötyessä selkeämmin kuin esimerkiksi tarkkaavuuden.

Hippokampusta kokonaisuutena tutkineissa *in situ* -hybridisaatiotutkimuksissa rotan hippokampuksen hermosolujen on osoitettu ilmentävän ainakin  $\alpha 2$ - $\alpha 4$ -,  $\alpha 7$ - ja  $\beta 2$ -alaysiköiden mRNA:ta (Wada ym. 1989; Séguéla ym. 1993; Alkondon ym. 1994), mutta  $\alpha 6$ -alaysikön mRNA:ta ei havaittu (Le Novère ym. 1996). Myöhemmin on

selvitetty myös hippokampuksen tiettyjen hermosolutyypin ilmentämiä nikotiinireseptorityyppejä. Immunoleimauksen ja  $\alpha$ -bungarotoksiinin sitoutumiskokeiden avulla  $\alpha 7$ -reseptoreita todettiin sijaitsevan lähes kaikissa rotan CA1-alueen synapseissa, sekä GABAergisissä että glutamatergisissä hermosoluissa ja sekä pre- että postsynaptisesti (Fabian-Fine ym. 2001). Kaksois-*in situ* -hybridisaatiolla on todettu lähes kaikkien rotan hippokampaalisten GABAergisten interneuronien ilmentävän  $\beta 2$ -alayksikön mRNA:ta, minkä lisäksi yli puolessa soluista havaittiin  $\alpha 7$ -mRNA:ta ja vain pienessä osassa  $\alpha 2$ - $\alpha 5$ - tai  $\beta 4$ -alayksiköiden mRNA:ta;  $\alpha 6$ - tai  $\beta 3$ -mRNA:ta ei havaittu GABAergisissä hermosoluissa (Son ja Winzer-Serhan 2008). Tästä pääteltiin  $\alpha 7$ -reseptorien olevan pääasiallinen interneuronien reseptorityyppi ja erilaisten  $\beta 2^*$ -reseptorityyppien olevan vähäisessä roolissa. Hiiren hippokampuksen nikotiinireseptorityyppien ilmentymistä on tutkittu rottaa vähemmän. Poistogeenisiä hiiriä ja [<sup>3</sup>H]epibatidiinin sitoutumista useilla aivoalueilla tutkineet Marks ym. (2006; 2007) totesivat hiiren hippokampuksessa esiintyvän kahta herkkyydeltään eroavaa  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorityyppiä sekä  $\alpha 7$ -reseptoreita. Lisäksi Brown ym. (2007) havaitsivat immuno-  
saostuskokeissaan hiiren hippokampuksessa esiintyvän myös  $\alpha 5^*$ -reseptoreita (luultavasti  $\alpha 4\alpha 5\beta 2^*$ ).

Hippokampaalisen välittäjäaineiden vapautumisen nikotiinireseptorivälitteisen säätelyn eniten tutkittu esimerkki on nikotiinireseptorien osuus GABA:n vapautumisen ja GABAergisen hermovälityksen säätelyssä, jossa keskushermoston pääsäännöstä poiketen somatodendriittisillä nikotiinireseptoreilla on todettu olevan merkittävä rooli. Näyttää on myös muiden välittäjäaineiden vapautumista säätelevien ja presynaptisesti sijaitsevien nikotiinireseptorien olemassaolosta.

#### 2.3.2.2. Dopamiinin vapautuminen hippokampuksessa

Keskiaivojen mustatumakkeen ja ventraalisen tegmentumin dopaminergiset hermosolut vapauttavat hippokampuksessa dopamiinia, joka vaikuttaa pääasiassa pyramidaalisolujen dopamiinireseptoreihin (Jay 2003). Keskiaivojen dopaminergisten projektoiden on esitetty olevan kriittisessä roolissa pitkäkestoisten muistijälkien muodostumisessa erityisesti hypoteettisen ventraalisen tegmentumin ja hippokampuksen välisen silmukan

kautta. Hypoteesin mukaan uuden informaation laukaisema hippokampuksesta lähtevä hermosignaali kulkeutuu eri aivoalueiden kautta ventraaliseen tegmentumiin, jonka seurauksena uutuuteen (novelty) reagoivat dopaminergiset hermosolut aktivoituvat, vapauttavat dopamiinia hippokampuksessa ja tehostavat synaptista muovautuvuutta ja muistijäljen muodostumista (Lisman ja Grace 2005).

Etenkin striatumiin verrattuna on hippokampuksen dopamiinivapautumisen nikotiini-reseptorivälitteistä säätelyä tutkittu vain vähän. Systemisesti tai paikallisesti annetun nikotiinin on todettu lisäävän rotan hippokampuksen solunulkoista dopamiinipitoisuutta *in vivo* -mikrodialyysillä mitattuna (Brazell ym. 1991; Toth ym. 1992), ja systeemisen annostelun vaikutusten on todettu olevan estettävissä paikallisesti hippokampukseen infusoiduilla nikotiiniantagonisteilla (Rossi ym. 2005). Nikotiiniagonistien on havaittu stimuloivan [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista myös rotan hippokampaalisissa aivoleikkeissä ja nikotiiniantagonistien inhiboivan tätä vaikutusta (Cao ym. 2005b). Selektiiviset  $\alpha 7$ -antagonistit eivät estäneet vapautumista, joten heteromeeriset reseptorit vaikuttavat olevan pääasiallinen vaikutuskohde. Vertailtuaan lukuisten eri agonistien ja antagonistien vaikutuksia vapautumiseen sekä omia tuloksiaan hippokampaalista [<sup>3</sup>H]noradrenaliinin vapautumista koskeviin tuloksiin (ks. 2.3.2.6.) Cao ym. (2005b) esittivät ainakin kahden eri tyyppin  $\alpha 3\beta 4^*$ -reseptorien olevan vaikutusten taustalla.

Yllä esitetyn niukan näytön perusteella ei ole mahdollista päätellä, ovatko havaitut dopamiinin vapautumista säätelevät nikotiinireseptorit luonteeltaan presynaptisia tai sijaitsevatko ne dopamiinihermosoluissa. Koska hippokampuksen dopaminergiset hermopäätteet ovat lähtöisin samoilta keskiaivojen alueilta kuin striatumin lukuisia eri nikotiinireseptorityyppejä ilmentävät dopaminergiset hermopäätteet (ks. 2.3.1.2.), voitaneen pitää todennäköisenä, että myös hippokampuksessa presynaptisilla nikotiini-reseptoreilla on rooli dopamiinin vapautumisen säätelyssä. Tämän varmistamiseksi tarvittaisiin kuitenkin tutkimuksia esimerkiksi nikotiiniagonistien kyvystä stimuloida [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista hippokampaalisista synaptosomeista. Lopuksi on muistettava myös keskiaivojen dopaminergisten hermosolujen somatodendriittiset nikotiinireseptorit, joiden aktivaatio lisää dopamiinin vapautumista striatumin alueella

(Maskos 2008); vastaavanlaisen hippokampaalista dopamiinin vapautumista lisäävän vaikutuksen olemassaolo lienee niin ikään todennäköistä.

### 2.3.2.3. Glutamaatin vapautuminen hippokampuksessa

Hippokampuksen pyramidaalihermosolut ja interneuronit vastaanottavat glutamatergisia eksitoivia projektioita useilta aivoalueilta, minkä lisäksi myös pyramidaalisolut itse voivat muodostaa glutamatergisia synapseja muiden hippokampuksen hermosolujen kanssa (Alkondon ym. 2011; Griguoli ja Cherubini 2012). Asetyylikoliinin on todettu säätelevän hippokampaalista glutamaatin vapautumista sekä muskariinireseptorien (Pitler ja Alger 1992) että nikotiinireseptorien välityksellä. Näyttöä on eri hippokampuksen alueilta sekä presynaptisten että muualla glutamatergisissa hermosoluissa sijaitsevien, glutamaatin vapautumista säätelevien nikotiinireseptorien olemassaolosta.

Useat tutkimukset ovat kohdistuneet hippokampuksen CA3-alueen pyramidaalisoluja hermottaviin pykäläpoimun glutamatergisten hermosolujen aksoneihin eli sammalsäikeisiin (mossy fibers). Rotan hippokampuksen aivoleikkeissä ja viljellyissä hermosoluissa tehdyt elektrofysiologiset tutkimukset ovat osoittaneet nikotiinin aiheuttavan CA3-pyramidaalisolujen eksitaatiota ja vaikutuksen välittyvän kohonneen presynaptisen kalsiumpitoisuuden kautta, mikä vuorostaan johtaa glutamaatin vapautumiseen sammalsäikeiden hermopäätteistä (Gray ym. 1996; Radcliffe ja Dani 1998; Radcliffe ym. 1999; Sharma ym. 2008). Koska  $\alpha 7$ -selektiiviset antagonistit estivät nikotiinin vaikutuksen, on nikotiinin pääteily vapauttavan glutamaattia aktivoimalla presynaptisia  $\alpha 7$ -nikotiinireseptoreita. Vahvaa lisänäyttöä nimenomaisesti presynaptisten reseptorien osuudesta glutamaatin vapautumiseen on saatu tutkimalla rotan hippokampuksesta valmistettuja puhdistettuja ja pääosin vain sammalsäikeiden hermopäätteitä sisältäviä synaptosomeja (Bancila ym. 2009). Nikotiini ja asetyylikoliini stimuloivat kemiluminesenssin perusteella mitattua glutamaatin vapautumista sammalsäiesynaptosomeista. Lisäksi immunoleimauksella todettiin synaptosomien sisältäneen  $\alpha 7$ -nikotiinireseptoreita.

Hippokampuksen CA1-alueen stratum radiatum (SR) -kerroksen interneuroneja pitkään elektrofysiologisesti tutkineet Alkondon kolleegoineen (Alkondon ja Albuquerque



2002; Alkondon ym. 2003; Alkondon ym. 2011) ovat selvittäneet muun muassa nikotiinireseptorivälitteisen glutamaatin vapautumisen osuutta interneuronien aktiivisuuden säätelyssä. Rotan hippokampaalisissa aivoleikkeissä nikotiiniagonistien ja endogeenisen asetyylikoliinin osoitettiin lisäävän SR-interneuronien aktiivisuutta paitsi suoraan interneuronien somatodendriittisten nikotiinireseptorien kautta (ks. 2.3.2.4.) myös vapauttamalla glutamaattia pyramidaalihermosolujen hermopäätteistä. Vaikutuksen todettiin olevan kumottavissa nikotiiniantagonisteilla, mutta päinvastoin kuin sammalsäikeiden tapauksessa,  $\alpha 7$ -selektiivisten yhdisteiden vaikutus glutamaatin vapautumiseen oli merkityksetön. Sen sijaan pyramidaalisolujen glutamaatin vapautumista säätelevät nikotiinireseptorit ovat ilmeisimmin heteromeerisiä, ja farmakologisen profiilin perusteella kirjoittajat esittivät kyseessä olevan  $\alpha 3\beta 4^*$ -reseptorityyppi, mahdollisesti  $\alpha 3\beta 4\beta 2$ . Glutamaatin vapautuminen oli kumottavissa myös tetrodotoksiinilla, mikä viittaa vaikutuksen taustalla olevien nikotiinireseptorien sijaitsemiseen pyramidaalisoluissa muualla kuin hermopäätteissä. Epäselvää kuitenkin on, sijaitsevatko reseptorit somatodendriittisesti vai jossain kohtaa aksonia, etenkin kun somatodendriittisten nikotiinireseptorien esiintymisestä CA1-alueen pyramidaalisoluissa on saatu ristiriitaisia tuloksia (Frazier ym. 1998; Ji ym. 2001).

Hippokampuksessa glutamaatin vapautumista säätelevien nikotiinireseptorien voidaan siis todeta koostuvan sekä  $\alpha 7$ -reseptoreista että heteromeerisistä reseptoreista ja reseptorityyppien vaihtelevan hermosolutyypistä ja/tai hippokampuksen osa-alueesta riippuen. Lisäksi pyramidaalisolujen tapauksessa on epäselvää mikä nikotiinireseptorien tarkka sijainti solussa on. Kuvaa hämärtää entisestään Zappettinin ym. (2010) tutkimus, jossa mitattiin nikotiiniagonistien stimuloimaa endogeenisen glutamaatin vapautumista rotan hippokampuksesta (tarkkaa aluetta määrittelemättä) valmistetuista perfusoiduista synaptosomeista. Koliinin stimuloima glutamaatin vapautuminen oli estettävissä MLA:lla muttei DH $\beta$ E:llä tai tetrodotoksiinilla, mikä viittaa vahvasti presynaptisten  $\alpha 7$ -reseptorien osuuteen ja tukee osaltaan sammalsäiekokeiden tuloksia. Kuitenkin myös  $\alpha 4\beta 2$ -selektiivinen agonisti 5-I-A-85380 stimuloi glutamaatin vapautumista, ja vaikutus oli estettävissä paitsi DH $\beta$ E:llä myös tetrodotoksiinilla. Tämä tulos viittaisi siihen, että ainakin joissain hippokampuksen glutamatergisissa hermopäätteissä myös preterminaaliset tai muutoin jänniteriippuvaisten natriumkanavien aktivoitumisen

vaativat  $\alpha 4\beta 2$ -reseptorit säätelevät glutamaatin vapautumista, joskin kyseisen agonistin  $\alpha 4\beta 2$ -selektiivisyyden aste on kyseenalainen (Jensen ym. 2005).

#### 2.3.2.4. GABA:n vapautuminen hippokampusessa

Hippokampuksen hermovälitystä säätelee suuri joukko erilaisia GABAergisiä interneuroneja, jotka muodostavat pyramidaalisoluja hermottavia ja interneuronien välisiä hermoyhteyksiä (Griguoli ja Cherubini 2012). Interneuronien aktiivisuuden säätelyssä puolestaan tärkeässä osassa on basaalisten etuaivojen kolinergisten projektoiden ja hippokampuksen kolinergisten interneuronien vapauttama asetyyli-koliini. Muskariinireseptoreilla (Pitler ja Alger 1992) ja sekä presynaptisilla että keskushermoston pääsäännöstä poiketen myös somatodendriittisillä nikotiini-reseptoreilla uskotaan olevan merkittävä rooli hippokampuksen GABAergisten interneuronien aktiivisuuden säätelyssä.

Presynaptisten GABA:n vapautumista säätelevien nikotiinireseptorien olemassaoloon viittaavat rotan viljeltyjä hippokampaalisia hermosoluja käyttäneet elektrofysiologiset tutkimukset, joissa nikotiinin todettiin tehostavan GABA-välitteistä inhibitorista hermovälitystä kalsiumriippuvaisella ja tetrodotoksiinille resistentillä mekanismilla (Fisher ym. 1998; Radcliffe ym. 1999). Metyylilykakkonitiini esti nikotiinin vaikutuksia, mistä pääteltiin niiden olevan  $\alpha 7$ -välitteisiä (Radcliffe ym. 1999). Näyttöä presynaptisten reseptorien osuudesta on saatu myös synaptosomikokeissa. Nikotiiniagonistit stimuloivat [ $^3\text{H}$ ]GABA:n vapautumista rotan ja hiiren hippokampusesta valmistetuista perfusoiduista synaptosomeista, mutta tulokset vaikutuksen taustalla olevien reseptorien alayksikkökoostumuksesta ovat osittain ristiriitaisia sekä viljellyillä soluilla saatujen tulosten kanssa että keskenään. Nikotiiniagonistien stimuloiman [ $^3\text{H}$ ]GABA:n vapautumisen on havaittu hiiren tapauksessa olevan estettävissä DH $\beta$ E:llä mutta ei  $\alpha$ -bungarotoksiinilla ja lähes häviävän  $\beta 2$ -alayksikön geneettisen poistamisen johdosta, mikä viittaisi vaikutuksen välittyvän  $\beta 2^*$ -reseptorien kautta  $\alpha 7$ -reseptorien sijaan (Wonnacott ym. 1989; Lu ym. 1998). Lisäksi McClure-Begley ym. (2009) totesivat monia eri poistogeenisiä hiirikantoja hyödyntäen asetyyli-koliinin stimuloiman [ $^3\text{H}$ ]GABA:n vapautumisen hippokampaalisista

synaptosomeista olevan kriittisesti  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorityypistä riippuvaa,  $\alpha 4\alpha 5\beta 2^*$ -reseptoreilla olevan vähäinen rooli ja  $\alpha 7$ - tai  $\beta 4^*$ -reseptorien poistamisen jäävän vaikutuksetta. Sen sijaan rotalla koliinin on havaittu aiheuttavan  $\alpha 7$ -antagonisteille herkkää endogeenisen GABA:n vapautumista hippokampaalisista synaptosomeista (Zappettini ym. 2011). Lisäksi myös 5-I-A-85380 stimuloi GABA:n vapautumista. Zappettinin ym. tulokset viittaisivat siis sekä  $\alpha 7$ - että  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien osuuteen rotan tapauksessa. Lisäksi mainittakoon, että kahdessa synaptosomitutkimuksessa  $\beta 2^*$ -välitteisen GABA:n vapautumisen havaittiin olevan osittain herkkä tetrodotoksiinille (Lu ym. 1998; Zappettini ym. 2011). Muissa synaptosomitutkimuksissa tetrodotoksiinin vaikutusta ei tutkittu. Vaikuttaisi siis siltä, että GABA:n vapautumista hippokampuksessa säätelevät sekä presynaptiset  $\alpha 7$ -reseptorit että presynaptiset ja preterminaaliset heteromeeriset reseptorit, mutta kokonaiskuva on toistaiseksi epäselvä.

Hippokampuksen GABAergisissä interneuroneissa on elektrofysiologisilla tutkimuksilla osoitettu esiintyvän myös muita kuin presynaptisia nikotiinireseptoreita. Rotan hippokampaalisissa aivoleikkeissä  $\alpha$ -bungarotoksiini ja MLA estävät sähköisesti stimuloitun asetyylikoliinin vapautumisen aiheuttamaa CA1-alueen interneuronien aktivaatiota, minkä on katsottu osoittavan interneuroneissa sijaitsevan nopeaan hermovälitykseen osallistuvia somatodendriittisiä  $\alpha 7$ -reseptoreita (Alkondon ym. 1998; Frazier ym. 1998). Rotan aivoleikkeiden ja viljeltyjen hippokampaalisten hermosolujen tutkimus on lisäksi osoittanut CA1-alueen interneuroneissa sijaitsevien nikotiinireseptorien aktivaation johtavan GABA:n vapautumiseen ja tämän välityksellä joko pyramidaaliermosolujen inhibitioon tai vaihtoehtoisesti muiden interneuronien inhibitioon ja sen myötä pyramidaalisolujen disinhibitioon (Alkondon ym. 1997; Alkondon ym. 1999; Ji ja Dani 2000). Nikotiiniagonistien stimuloiman vapautumisen farmakologisen karakterisoinnin perusteella vaikutuksen pääteltiin välittyvän sekä  $\alpha 7$ - että  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien kautta. Vaikutus oli estettävissä tetrodotoksiinilla, joten näiden tutkimusten havaitsemat reseptorit todennäköisimmin sijaitsevat muualla kuin hermopäätteissä, mutta epäselvää on, ovatko ne sijainniltaan somatodendriittisiä, aksonaalisia vai preterminaalisia. Mahdollista lienee, että kyseiset reseptorit vastaavat muussa tutkimuksessa kuvattuja somatodendriittisiä  $\alpha 7$ -reseptoreita (Alkondon ym. 1998; Frazier ym. 1998) ja preterminaalisia  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptoreita (Zappettini ym. 2011).

### 2.3.2.5. Asetyylikoliinin vapautuminen hippokampuksessa

Hippokampuksessa asetyylikoliinia vapauttavat basaalisten etuaivojen kolinergisten projektoiden ja hippokampuksen kolinergisten interneuronien hermopäätteet (Griguoli ja Cherubini 2012). Muskariinireseptorien tiedetään säätelevän asetyylikoliinin vapautumista inhibitorisesti (Zhang ym. 2002), mutta nikotiinireseptorien osuudesta ei juurikaan ole näyttöä. Systemisesti annosteltu nikotiini lisää asetyylikoliinin vapautumista rotan hippokampuksessa *in vivo* -mikrodialyysillä mitattuna todennäköisimmin  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien välityksellä (Tani ym. 1998). Lisäksi nikotiiniagonistit stimuloivat [ $^3\text{H}$ ]asetyylikoliinin vapautumista rotan hippokampuksesta valmistetuista synaptosomeista todennäköisesti heteromeeristen nikotiinireseptorien välityksellä (Wilkie ym. 1996). Niukkojen todisteiden perusteella voidaan todeta olevan viitteitä asetyylikoliinin vapautumista säätelevistä hippokampaalisista presynaptisista nikotiinireseptoreista, mutta pidemmälle meneviä johtopäätöksiä ei voida tehdä.

### 2.3.2.6. Noradrenaliinin vapautuminen hippokampuksessa

Aivorungon locus coeruleuksen noradrenergiset hermosyyt vapauttavat hippokampuksessa noradrenaliinia (Foote ym. 1983). Paikallisesti annosteltu nikotiini ei lisännyt rotan hippokampuksen solunulkoista noradrenaliinipitoisuutta *in vivo* (Toth ym. 1992), ja systemisesti annostellun nikotiinin hippokampuksen noradrenaliinipitoisuutta kohottavaa vaikutusta pidetään pääasiassa aivorungon nikotiinireseptorien kautta välittyvänä (Fu ym. 1998). Monet synaptosomeja ja aivoleikkeitä hyödyntäneet *in vitro* -tutkimukset ovat kuitenkin löytäneet todisteita hippokampaalista noradrenaliinin vapautumista säätelevistä nikotiinireseptoreista.

Ensimmäiset viitteet noradrenaliinin vapautumista säätelevistä presynaptisista nikotiinireseptoreista havaitsivat Clarke ja Reuben (1996), jotka totesivat nikotiiniagonistien stimuloivan [ $^3\text{H}$ ]noradrenaliinin vapautumista rotan hippokampaalisista synaptosomeista tetrodotoksiinille resistentillä tavalla. Vapautumisen farmakologisen karakterisoinnin perusteella todettiin reseptorityypin olevan heteromeerinen, mahdollisesti  $\alpha 3\beta 4^*$ . Tätä tulkintaa tukien on myöhemmin havaittu nikotiinin

stimuloiman [<sup>3</sup>H]noradrenaliinin vapautumisen rotan hippokampaalisista synaptosomeista olevan valtaosin resistentti  $\alpha 3\beta 2^*/\alpha 6\beta 2^*$ -selektiiviselle  $\alpha$ -konotoksiini MII:lle (Kulak ym. 1997), kun taas  $\alpha 3\beta 4^*$ -selektiivinen  $\alpha$ -konotoksiini AuIB:n estää osan vapautumisesta (Luo ym. 1998). Myös Azam kolleegoineen (Azam ja McIntosh 2006; Azam ym. 2010) ovat selvittäneet eri reseptorityyppien osuutta tutkimalla nikotiiniagonistien stimuloimaa [<sup>3</sup>H]noradrenaliinin vapautumista sekä rotan että poistogeenisten hiirten hippokampaalisista synaptosomeista ja useiden alayksikkö-selektiivisten konotoksiinien vaikutusta vapautumiseen. Rotan tapauksessa aiempaa tukien noradrenaliinin vapautumisen todettiin välittyvän  $\beta 4^*$ -reseptorien kautta, joista noin kolmannes on  $\alpha 3\beta 4^*$ -muotoa; lisäksi todettiin, että  $\alpha 6^*$ -reseptoreilla ei ole osuutta vapautumiseen. Hiirellä noradrenaliinin vapautumisen sen sijaan todettiin välittyvän  $\beta 2^*$ -reseptorien kautta, joista valtaosassa on myös  $\alpha 6$ -,  $\alpha 4$ - ja  $\beta 3$ -alayksiköitä ja noin kolmanneksessa lisäksi  $\beta 4$ -alayksikkö. Tulosten perusteella kirjoittajat esittivät hiiren hippokampuksessa esiintyvän useita erilaisia noradrenaliinin vapautumista sääteleviä presynaptisia  $\alpha 6\beta 2^*$ - ja  $\alpha 6\beta 4^*$ -tyyppien nikotiinireseptoreita, joihin kuuluvat ainakin  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ - ja  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3\beta 4$ -reseptorit (Azam ym. 2010).

Noradrenaliinin vapautumista on tutkittu paljon myös hippokampaalisissa aivoleikkeissä. Nikotiiniagonistit stimuloivat [<sup>3</sup>H]noradrenaliinin vapautumista rotan aivoleikkeistä heteromeeristen nikotiinireseptorien (todennäköisesti  $\alpha 3\beta 4^*$ ) välityksellä, ja osa vapautumisesta on estettävissä tetrodotoksiinilla (Sacaan ym. 1995; Sershen ym. 1997; Anderson ym. 2000; Amtage ym. 2004; Scholze ym. 2007). [<sup>3</sup>H]noradrenaliinin vapautuminen hiiren aivoleikkeistä on myös valtaosin estettävissä tetrodotoksiinilla mutta riippuu kriittisesti  $\beta 2$ -alayksiköstä (Scholze ym. 2007). Aivoleiketutkimusten tulosten voidaan todeta sopivan hyvin yhteen synaptosomitulosten kanssa, mutta osoittavan myös muilla kuin noradrenergisten hermopäätteiden presynaptisilla reseptoreilla olevan osuus noradrenaliinin vapautumisen säätelyssä. Nämä reseptorit voivat olla esimerkiksi aksonaalisia tai preterminaalisia noradrenergisten solujen reseptoreita, tai vaikutukset voivat välittyä muiden välittäjäaineiden vapautumisen kautta. Jälkimmäiseen viittaa havainto  $\alpha 7$ -reseptorivälitteisestä [<sup>3</sup>H]noradrenaliinin vapautumisesta rotan hippokampaalisista aivoleikkeistä, joka oli estettävissä glutamaatti- ja GABA-reseptorien antagonisteilla (Barik ja Wonnacott 2006).

### 2.3.2.7. Serotoniinin vapautuminen hippokampuksessa

Keskiaivojen raphen tumakkeesta lähtevien serotonergisten hermosyiden vapauttama serotoniini säätelee hippokampuksen hermovälitystä suurelta osin ei-synaptisesti (Descaries ym. 1990). Hippokampukseen projisoivien raphen tumakkeen hermosolujen on immunoleimauksella todettu ilmentävän  $\alpha 7$ -nikotiinireseptoreita (Aznar ym. 2005), mutta näyttö nikotiinireseptoriligandien vaikutuksesta serotoniinin vapautumiseen on ristiriitaista.

Käyttäytymiseläinkokeissa nikotiinin paikallisen annostelun hippokampukseen on todettu vaikuttavan anksiogeenisesti, ja anksiogeeninen vaikutus on estettävissä sekä  $\alpha 7$ -antagonisteilla että 5-HT<sub>1A</sub>-antagonistilla, mistä on päätelty nikotiinin lisäävän serotoniinin vapautumista hippokampuksessa  $\alpha 7$ -välitteisesti (Kenny ym. 2000a; Tucci ym. 2003). Nikotiinin on myös havaittu stimuloivan [<sup>3</sup>H]serotoniinin vapautumista rotan perfusoiduista hippokampaalisista aivoleikkeistä niin ikään  $\alpha 7$ -välitteisesti (Kenny ym. 2000b; Tucci ym. 2003). Nikotiinipitoisuus oli aivoleiketutkimuksissa kuitenkin varsin korkea (50–500  $\mu$ M), ja vaikutus oli kalsiumista riippumaton. Kenny ym. (2000b) ehdottivat selitykseksi vaaditulle korkealle nikotiinipitoisuudelle reseptorien poikkeuksellista epäherkkyyttä tai epäsuoraa mekanismia esimerkiksi glutamaatin tai GABA:n vapautumisen välityksellä. Toisissa tutkimuksissa nikotiinin (100  $\mu$ M) ei havaittu lisäävän [<sup>3</sup>H]serotoniinin vapautumista rotan hippokampaalisista aivoleikkeistä (Lendvai ym. 1996) tai synaptosomeista (Reuben ja Clarke 2000). Lisäksi *in vivo* -mikrodialyysikokeissa nikotiinilla ei paikallisesti annosteltuna ollut vaikutusta rotan hippokampuksen solunulkoiseen serotoniinipitoisuuteen (Toth ym. 1992), ja systeemisesti annosteltuna vaikutus oli serotoniinipitoisuutta vähentävä (Rossi ym. 2005). Kaiken kaikkiaan vaikuttaisi siltä, ettei hippokampuksessa esiinny ainakaan suoraan serotoniinin vapautumista sääteleviä nikotiinireseptoreita.

### 2.3.3. Prefrontaalinen aivokuori

#### 2.3.3.1. Prefrontaalisen aivokuoren rakenne ja nikotiinireseptorit

Prefrontaalaisella aivokuorella (prefrontal cortex) tarkoitetaan yksinkertaisesti määriteltynä otsalohkojen etuaivokuoren etummaista osaa, joskin tarkka määrittely anatomisten, neurokemiallisten ja toiminnallisten ominaisuuksien perusteella vaihtelee, ja muun muassa erot kädellisen ja jyrsijän prefrontaalisen aivokuoren välillä ovat olleet tieteellisen erimielisyyden kohteena (Uylings ym. 2003; Seamans ym. 2008). Prefrontaalinen aivokuori vastaanottaa ja integroi muun muassa kaikista aisteista saapuvaa informaatiota, ja sitä pidetään esimerkiksi toiminnanohjauksen, kognitiivisen joustavuuden, tarkkaavuuden ja työmuistin kannalta keskeisenä aivoalueena (Miller ja Cohen 2001; Alvarez ja Emory 2006; Seamans ym. 2008). Muun muassa riippuvuuden (Goldstein ja Volkow 2011) sekä kaksisuuntaisen mielialahäiriön ja skitsofrenian (Chai ym. 2011) on havaittu olevan yhteydessä prefrontaalisen aivokuoren epänormaaliin toimintaan.

Muiden aivokuoren alueiden tapaan prefrontaalinen aivokuori on rakenteeltaan kerrosmainen ja sisältää glutamatergisia pyramidaalihermosoluja sekä usean eri tyyppin GABAergisiä interneuroneja (Kawaguchi ja Kondo 2002; Mansvelder ym. 2006). Pyramidaalihermosolujen välityksellä prefrontaalinen aivokuori hermottaa monia kortikaalisia, subkortikaalisia ja aivorungon alueita, joista tärkeimpinä projektio-kohteina pidetään striatumin eri osa-alueita (Alvarez ja Emory 2006). Integroivan roolinsa mukaisesti prefrontaalinen aivokuori myös vastaanottaa projektioita monilta aivoalueilta, kuten dopaminergisia projektioita keskiaivoista (lähinnä ventraalisesta tegmentumista), glutamatergisia projektioita talamuksesta ja hippokampuksesta, noradrenergisia projektioita keskiaivojen locus coeruleuksesta, serotonergisia projektioita keskiaivojen raphe-tumakkeesta ja sekä kolinergisia, GABAergisiä että glutamatergisia projektioita basaalisista etuaivoista (Laroche ym. 2000; Henny ja Jones 2008; Dos Santos Coura ja Granon 2012).

Nikotiinireseptorien on esitetty olevan merkittävässä roolissa kognitiivisten toimintojen säätelyssä, ja prefrontaalisen aivokuoren uskotaan olevan hippokampuksen ohella tärkeä nikotiinin kognitiivista suoriutumista parantavan vaikutuksen kohde (Hahn ym. 2003; Levin ym. 2006; Mansvelder ym. 2006; Dos Santos Coura ja Granon 2012). *In situ* -hybridisaatiotutkimuksissa hiiren aivokuorella on havaittu  $\alpha 3$ - $\alpha 5$ - sekä  $\beta 2$ -alaysiköiden mRNA:ta (Marks ym. 1992) ja rotan aivokuorella  $\alpha 3$ - $\alpha 5$ -,  $\alpha 7$ - ja  $\beta 2$ -alaysiköiden mutta ei  $\alpha 2$ -,  $\alpha 6$ - tai  $\beta 3$ -alaysiköiden mRNA:ta (Wada ym. 1989; Séguéla ym. 1993; Le Novère ym. 1996). Immunosäostusta hyödyntäen on nimenomaisesti prefrontaalilla aivokuorella havaittu esiintyvän rotalla  $\alpha 3$ - $\alpha 5$ - sekä  $\beta 2$ -alaysiköitä mutta hyvin vähän jos lainkaan  $\alpha 2$ -,  $\alpha 6$ -,  $\beta 3$ - tai  $\beta 4$ -alaysiköitä (Livingstone ym. 2009), ja marsulla  $\alpha 7$ -alaysiköitä pre- ja postsynaptisesti glutamatergisissa ja GABAergisissä hermosoluissa (Lubin ym. 1999). Osassa prefrontaalisen aivokuoren GABAergisiä interneuroneja on RT-PCR:llä havaittu rotalla  $\alpha 4$ -,  $\alpha 5$ - ja  $\beta 2$ -alaysiköiden ja hiirellä  $\alpha 4$ -,  $\alpha 7$ - ja  $\beta 2$ -alaysiköiden mRNA:ta (Porter ym. 1999; Couey ym. 2007). Lisäksi radioleimattujen nikotiiniligandien sitoutumista tutkimalla on todettu jyrsijän aivokuorella esiintyvän ainakin  $\alpha 4\beta 2^*$ - ja  $\alpha 7$ -reseptoreita (Clarke ym. 1985; Marks ym. 2007). Kuten striatumissa ja hippokampuksessa myös prefrontaalilla aivokuorella nikotiinireseptorien on todettu säätelevän monien välittäjäaineiden vapautumista.

### 2.3.3.2. Dopamiinin vapautuminen prefrontaalilla aivokuorella

Keskiaivojen (pääasiassa ventraalisen tegmentumin mutta myös mustatumakkeen) dopaminergisten hermosolujen hermopäätteet vapauttavat prefrontaalilla aivokuorella dopamiinia, joka sekä pyramidaalihermosoluissa että interneuroneissa sijaitsevien dopamiinireseptorien välityksellä osallistuu kognitiivisten toimintojen säätelyyn (Floresco ja Magyar 2006; Björklund ja Dunnett 2007). Nikotiinireseptorien on todettu säätelevän dopamiinin vapautumista striatumissa tapaan myös prefrontaalilla aivokuorella. Nikotiini lisää rotan etuaivokuoren solunulkoista dopamiinipitoisuutta sekä systeemisesti että paikallisesti annettuna *in vivo* -mikrodialyysillä mitattuna (Toth ym. 1992; Nisell ym. 1996; Marshall ym. 1997; Rossi ym. 2005; Livingstone ym. 2009), ja vaikutus välittyy todennäköisesti heteromeeristen reseptorien kautta



(Livingstone ym. 2009). Lisäksi useat *in vitro* -tutkimukset ovat selvittäneet nikotiinireseptorien osuutta dopamiinin vapautumisessa.

Nikotiiniagonistit stimuloivat [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista rotan (Whiteaker ym. 1995) ja hiiren (Grady ym. 2002) etuaivokuoresta valmistetuista perfusoiduista synaptosomeista, viitaten presynaptisten nikotiinireseptorien olemassaoloon. Hiiren tapauksessa vaikutus oli  $\beta$ 2-alayksiköstä ja kalsiumista riippuvainen, osittain herkkä  $\alpha$ -konotoksiini MII:lle viitaten  $\alpha$ 3 $\beta$ 2\*/ $\alpha$ 6 $\beta$ 2\*-reseptorien osuuteen ja muutoinkin samantapainen kuin striatumissa. Muut tutkimukset (ja kaikki tutkimukset, jotka ilmoittavat tutkineensa nimenomaisesti prefrontaalista aivokuorta) on tehty aivoleikkeillä, ja tulokset ovat osittain hiiren synaptosomituloksista poikkeavat.

Nikotiiniagonistit stimuloivat [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista rotan prefrontaalisen aivokuoren leikkeistä (Puttfarcken ym. 2000; Rao ym. 2003; Cao ym. 2005a; Anderson ym. 2009; Livingstone ym. 2009). Hiiren synaptosomituloksia vastaten selektiivisillä ligandeilla on osoitettu vaikutuksen välittyvän  $\beta$ 2\*-reseptorien kautta (Livingstone ym. 2009), ja korkean herkkyuden  $\alpha$ 4 $\beta$ 2\*-reseptorien on esitetty olevan pääasiallisessa vastuussa vapautumisesta (Anderson ym. 2009).  $\alpha$ 7-reseptoreilla joko ei ole havaittu olevan osuutta vapautumisessa (Cao ym. 2005a) tai niiden aktivaation on todettu vapauttavan dopamiinia epäsuorasti glutamaatin vapauttamisen kautta (Livingstone ym. 2009). Sen sijaan hiiren synaptosomituloksista poiketen on todettu, ettei  $\alpha$ -konotoksiini MII estä nikotiiniagonistien stimuloimaa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista rotan prefrontaalisisista aivoleikkeistä (Cao ym. 2005a; Livingstone ym. 2009). Yhdessä tutkimuksessa todettiin stimuloidun dopamiinin vapautumisen olevan lähes kokonaan tetrodotoksiinille herkkää, mikä viittaisi vaikutuksen välittyvän pääasiassa muiden kuin presynaptisten reseptorien kautta (Rao ym. 2003). Muissa tutkimuksissa ei tutkittu tetrodotoksiinin vaikutusta.

Edellä kuvattu ero hiiren synaptosomitulosten ja rotan aivoleiketulosten välillä voi johtua esimerkiksi lajien välisistä eroista nikotiinireseptoripopulaatioissa. Toisaalta yksi selitys erolle voisi olla myös vaikutuksen välittyminen aivoleikkeissä pääasiassa preterminaalisten tai muutoin ei-presynaptisten,  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistenttien

reseptorien kautta. Tällaista hypoteesia tukevana voitaneen varauksin pitää Löfflerin ym. (2006) tutkimusta, jossa nikotiinin stimuloima [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen ihmisen aivokuoren leikkeistä oli samassa määrin estettävissä sekä tetrodotoksiinilla että  $\alpha$ -konotoksiini MII:lla. Asian selvittämiseksi vaadittaisiin kuitenkin lajeja vertailevia tutkimuksia, joissa voitaisiin selvittää esimerkiksi dopamiinin vapautumista prefrontaalisesta aivokuoresta valmistetuista synaptosomeista tai nikotiiniagonistien vaikutusten mahdollisten eri komponenttien herkkyyttä tetrodotoksiinille aivoleikkeissä. Lopuksi mainittakoon jälleen keskiaivojen dopaminergisten hermosolujen somatodendriittiset nikotiinireseptorit, jotka säätelevät hermosolujen aktiivisuutta ja dopamiinin vapautumista ainakin striatumin alueella (Maskos 2008).

### 2.3.3.3. Glutamaatin vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella

Prefrontaalisella aivokuorella glutamaattia vapauttavat muun muassa talamuksesta, hippokampuksesta ja basaalisista etuaivoista lähtevät hermosyyt, ja glutamatergiset pyramidaalisolut voivat muodostaa myös risti yhteyksiä keskenään (Laroche ym. 2000; Henny ja Jones 2008; Dos Santos Coura ja Granon 2012). Nikotiinireseptorien on todettu säätelevän glutamaatin vapautumista striatumin ja hippokampuksen tapaan myös prefrontaalisella aivokuorella. Lisäksi viitteitä on myös somatodendriittisten heteromeeristen nikotiinireseptorien sijaitsemisesta rotan prefrontaalisissa pyramidaalisoluissa (Kassam ym. 2008).

Nikotiiniagonistit stimuloivat kalsiumriippuvaisesti [<sup>3</sup>H]aspartaatin vapautumista rotan etuaivokuoresta (Rousseau ym. 2005) ja prefrontaalisesta aivokuoresta (Dickinson ym. 2008) valmistetuista synaptosomeista, ja vaikutusten farmakologiset ominaisuudet viittaavat niiden taustalla olevan sekä  $\alpha 7$ - että  $\beta 2^*$ -reseptoreita. Lisäksi etuaivokuoren synaptosomien immunoleimauksella todettiin glutamatergisissa hermopäätteissä sijaitsevan nikotiinireseptoreita (Rousseau ym. 2005). Nikotiiniagonistien on myös todettu tehostavan  $\alpha 7$ -välitteisesti depolarisaation stimuloimaa kalsiumriippuvaista [<sup>3</sup>H]aspartaatin vapautumista ihmisen aivokuoresta valmistetuista synaptosomeista, joskaan pelkillä nikotiiniagonisteilla ei ollut vaikutusta (Marchi ym. 2002). Synaptosomeilla saadut tulokset viittaavat siis glutamaatin vapautumista sääteleviin

presynaptisiin nikotiinireseptoreihin prefrontaalisella aivokuorella. Elektrofysiologiset tutkimukset rotan ja hiiren prefrontaalisissa aivoleikkeissä ovat puolestaan todenneet nikotiiniagonistien lisäävän pyramidaalisolujen glutamaattivälitteistä eksitaatiota  $\beta 2^*$ -reseptorien kautta (Vidal ja Changeux 1993; Lambe ym. 2003). Tetrodotoksiini kuitenkin esti nikotiiniagonistien vaikutuksen, mikä voi tarkoittaa vaikutuksen välittyneen pääasiassa muiden kuin presynaptisten nikotiinireseptorien kautta.

Nikotiiniagonistien paikallinen annostelu johtaa glutamaatin vapautumiseen prefrontaalisella aivokuorella myös *in vivo*. Glutamaatin vapautumisen nikotiini-reseptorivälitteistä säätelyä on *in vivo* tutkittu mikrodialyysillä (Gioanni ym. 1999) ja nopean aikaresoluution mahdollistavilla glutamaattiherkillä mikroelektrodeilla (Parikh ym. 2008; Konradsson-Geuken ym. 2009; Parikh ym. 2010). Rotan tapauksessa  $\alpha$ -bungarotoksiini esti osan nikotiinin stimuloimasta glutamaatin vapautumisesta ja koliinin vaikutuksen kokonaan, mikä viittaa sekä  $\alpha 7$ -reseptorien että heteromeeristen reseptorien olemassaoloon (Konradsson-Geuken ym. 2009). Parikh ym. (2008; 2010) puolestaan totesivat selektiivisten nikotiiniagonistien vaikutuksia ja poistogeenisiä hiiriä tutkittuaan hiiren tapauksessa sekä  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien että  $\alpha 7$ -reseptorien säätelevän glutamaatin vapautumista,  $\alpha 7$ -reseptorin kontrolloidessa pääasiassa vapautumisen kestoa. Lisäksi rotalla suoritetuin leesiokokein todettiin glutamaatin vapautuvan pääasiassa talamokortikaalisten hermosyiden hermopäätteistä. Samoin kuin aivoleikkeissä tetrodotoksiinin on todettu estävän valtaosan myös *in vivo* havaitusta nikotiiniagonistien aiheuttamasta glutamaatin vapautumisesta (Gioanni ym. 1999; Parikh ym. 2008; Parikh ym. 2010). Prefrontaalisella aivokuorella presynaptisten reseptorien merkitys vaikuttaisi siis olevan kaiken kaikkiaan vähäinen ainakin eksogeenisten nikotiiniagonistien stimuloimassa glutamaatin vapautumisessa.

#### 2.3.3.4. GABA:n vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella

Rotan ja hiiren prefrontaalisella aivokuorella esiintyy suuri joukko erilaisia GABAergisiä interneuroneja, jotka voidaan karkeasti jakaa nopeasti laukoviin (fast spiking) ja hitaasti laukoviin (non-fast spiking; Kawaguchi ja Kondo 2002; Couey ym. 2007). Lisäksi prefrontaalisella aivokuorella GABA:a voivat vapauttaa basaalisten

etuaivojen GABAergiset projektiot (Henny ja Jones 2008). Keskiaivojen nousevat kolinergiset projektiot päättyvät prefrontaalaisella aivokuorella usein GABAergisten interneuronien synapsien läheisyyteen, ja vapautuva asetyylikoliini säätelee GABA:n vapautumista pääasiassa ei-synaptisesti (Aracri ym. 2010).

Nikotiini ja asetyylikoliini stimuloivat [<sup>3</sup>H]GABA:n vapautumista hiiren aivokuoresta valmistetuista synaptosomeista (Lu ym. 1998; McClure-Begley ym. 2009). Poistogeenisten hiirten synaptosomeja tutkimalla osoitettiin asetyylikoliinin stimuloiman [<sup>3</sup>H]GABA:n vapautumisen olevan riippuvaista  $\alpha 4$ - ja  $\beta 2$ -alaysiköistä ja  $\alpha 5$ -alaysiköllä olevan myös tärkeä rooli, kun taas  $\alpha 7$ - tai  $\beta 4$ -alaysiköiden poistamisella ei ollut vaikutusta vapautumiseen (McClure-Begley ym. 2009). Tulosten perusteella voidaan esittää presynaptisten  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien, joista osa on  $\alpha 4\alpha 5\beta 2^*$ -muotoa, säätelevän GABA:n vapautumista ainakin koko aivokuoren tasolla.

Aivoleikkeillä tehdyt elektrofysiologiset tutkimukset tukevat synaptosomikokeiden tuloksia, mutta ovat paljastaneet myös muiden kuin presynaptisten reseptorien tärkeän merkityksen. Nikotiini tehostaa hiiren prefrontaalisen aivokuoren leikkeissä tetrodotoksiinille ja metyyliylilykakonitiinille resistentillä mekanismilla pyramidisolujen GABAergistä inhibitiota, mikä osaltaan tukee johtopäätöstä presynaptisten heteromeeristen reseptorien olemassaolosta (Aracri ym. 2010). Presynaptisten reseptorien esitettiin sijaitsevan nopeasti laukovien interneuronien hermopäätteissä. Nikotiini-reseptorien stimulaatio tehostaa GABA-vapautumista kuitenkin myös prefrontaalisen aivokuoren hitaasti laukovien interneuronien somatodendriittisten nikotiinireseptorien välityksellä. Somatodendriittisten reseptorien on niiden farmakologisten ominaisuuksien ja interneuronien RT-PCR -analyysien perusteella esitetty olevan rotalla (koko aivokuoren tasolla)  $\alpha 4\beta 2^*$ - ja  $\alpha 4\alpha 5\beta 2^*$ -tyypin reseptoreita (Porter ym. 1999) ja hiirellä sekä  $\alpha 4\beta 2^*$ - että  $\alpha 7$ -tyypin reseptoreita (Couey ym. 2007). Myös ihmisen aivokuoren leikkeiden interneuroneissa on havaittu elektrofysiologisesti  $\alpha 7$ - ja  $\beta 2^*$ -tyypin somatodendriittisiä reseptoreita sekä viitteitä presynaptisista ja/tai preterminaalisista GABA:n vapautumista tehostavista  $\beta 2^*$ -reseptoreista (Alkondon ym. 2000).

GABA:n vapautumista prefrontaalisella aivokuorella säätelevät siis ilmeisesti ainakin hiirellä sekä presynaptiset  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorit että somatodendriittiset  $\alpha 7$ - ja  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorit. Lisäksi nikotiini lisää GABA:n vapautumista epäsuorasti tehostamalla glutamaatin vapautumista sekä hiiren että rotan prefrontaalisissa leikkeissä (Couey ym. 2007; Aracri ym. 2010). Elektrofysiologisissa tutkimuksissa tetrodotoksiinille resistenttiä nikotiinin vaikutusta ei havaittu hitaasti laukovien solujen tapauksessa (Couey ym. 2007). Nopeasti laukovien solujenkin tapauksessa vaikutus oli pieni verrattuna spontaaniin GABAergiseen aktiivisuuteen tai nikotiinin muiden kuin presynaptisten reseptorien kautta välittyvään vaikutukseen (Aracri ym. 2010). Presynaptisten nikotiinireseptorien osuus prefrontaalisen GABA-vapautumisen säätelyssä saattaa siis olla kaiken kaikkiaan vähäinen.

#### 2.3.3.5. Asetyylikoliinin vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella

Basaalisten etuaivojen hermosolujen laaja-alaiset kolinergiset projektiot vapauttavat asetyylikoliinia muun muassa prefrontaalisella aivokuorella, missä se pääasiassa ei-synaptisesti säätelee muiden välittäjäaineiden vapautumista ja eksitoi hermosoluja myös suoraan (Henny ja Jones 2008; Aracri ym. 2010). Lisäksi prefrontaalisella aivokuorella on esitetty olevan myös asetyylikoliinia vapauttavia interneuroneja (Mansvelder ym. 2006), joiden rooli kuitenkin vaikuttaisi olevan korkeintaan vähäinen (Parikh ym. 2010). Asetyylikoliinin vapautumista säätelevistä nikotiinireseptoreista on hieman enemmän näyttöä aivokuoren kuin striatum tai hippokampuksen tapauksessa, mutta suurin osa tutkimuksista ei ole tutkinut nimenomaisesti prefrontaalista aivokuorta, ja osa tuloksista on ristiriitaisia.

Systeemisesti annosteltu nikotiini lisää *in vivo* -mikrodialyysillä mitattua rotan etuaivokuoren solunulkoista asetyylikoliinipitoisuutta heteromeeristen nikotiinireseptorien välityksellä (Tani ym. 1998). Nikotiiniagonistit voivat myös jonkin verran lisätä [ $^3\text{H}$ ]asetyylikoliinin vapautumista hiiren (Rowell ja Winkler 1984), rotan (Marchi ym. 1999) ja ihmisen (Marchi ym. 2002) aivokuoresta valmistetuista synaptosomeista. Ihmisellä vapautuminen välittyy todennäköisimmin  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien kautta (Marchi ym. 2002), ja rotalla todettiin myös inhiboivien muskariinireseptorien osallistuvan

vapautumisen säätelyyn (Marchi ym. 1999). Synaptosomituloksista poiketen nikotiini- tai muskariinireseptorien stimulaatiolla ei havaittu olevan vaikutuksia [<sup>3</sup>H]asetyylikoliinin vapautumiseen rotan ja ihmisen aivokuoresta valmistetuista perfusoiduista aivoleikkeistä (Amtage ym. 2004). Nimenomaisesti prefrontaalisen aivokuoren neurokemian *in vivo* mikroelektrodeilla tutkineet Parikh ym. (2008; 2010) ovat todenneet nikotiiniagonistien stimuloivan asetyylikoliinin vapautumista, mutta vaikutuksen olevan epäsuora ja riippuvainen  $\alpha 4\beta 2^*$ - ja  $\alpha 7$ -välitteisestä glutamaatin vapautumisen lisääntymisestä (ks. 2.3.3.3.). Toistaiseksi on epäselvää, mikä on synaptosomikokeissa havaittujen presynaptisten nikotiinireseptorien merkitys asetyylikoliinin vapautumisessa ja mikä selittää vaikutusten puuttumisen aivoleikkeissä.

#### 2.3.3.6. Noradrenaliinin vapautuminen prefrontalisella aivokuorella

Prefrontalisella aivokuorella noradrenaliinia vapautuu aivorungon locus coeruleuksen hermosolujen hermopäätteistä ja se osallistuu kriittisellä tavalla kognitiivisten toimintojen säätelyyn, mutta prefrontaalisen noradrenaliinin vapautumisen nikotiinireseptorivälitteisestä säätelystä ei juuri ole näyttöä (Foote ym. 1983; Dos Santos Coura ja Granon 2012). Systemisesti annosteltu nikotiini lisää *in vivo* -mikrodialyysikokeissa rotan prefrontaalisen aivokuoren solunulkoista noradrenaliinipitoisuutta osittain nikotiinireseptorivälitteisesti (Rossi ym. 2005). Nikotiiniagonistien on myös osoitettu stimuloivan kalsiumriippuvaisesti [<sup>3</sup>H]noradrenaliinin vapautumista rotan prefrontalisesta aivokuoresta ja ihmisen aivokuoresta valmistetuista aivoleikkeistä (Woo ym. 2002; Rao ym. 2003; Amtage ym. 2004). Ihmisen aivokuoren tapauksessa noradrenaliinin vapautumista lisäävän vaikutuksen todettiin välittyvän heteromeeristen mutta ei  $\alpha 7$ -reseptorien kautta, sillä vaikutus ei ollut estettävissä  $\alpha 7$ -selektiivisillä antagonisteilla (Amtage ym. 2004). Osa vaikutuksesta oli estettävissä  $\alpha$ -konotoksiini MII:lla, joten  $\alpha 3\beta 2^*$ - tai  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptoreilla vaikuttaa olevan merkittävä rooli. Kaikissa aivoleiketutkimuksissa valtaosa stimuloidusta noradrenaliinin vapautumisesta oli estettävissä tetrodotoksiinilla, joten vaikutuksen taustalla olevat nikotiinireseptorit saattavat sijaita pääasiassa muualla kuin hermopäätteissä presynaptisesti. Amtage ym. (2004) esittivät noradrenaliinin vapautumista säätelevien nikotiinireseptorien sijaitsevan ihmisen noradrenergisissa

aksoneissa preterminaalaisesti, mutta havaitsivat myös epäsuoran glutamatergisten hermopäätteiden nikotiinireseptorien kautta välittyvän vaikutuksen.

#### 2.3.3.7. Serotoniinin vapautuminen prefrontaalisella aivokuorella

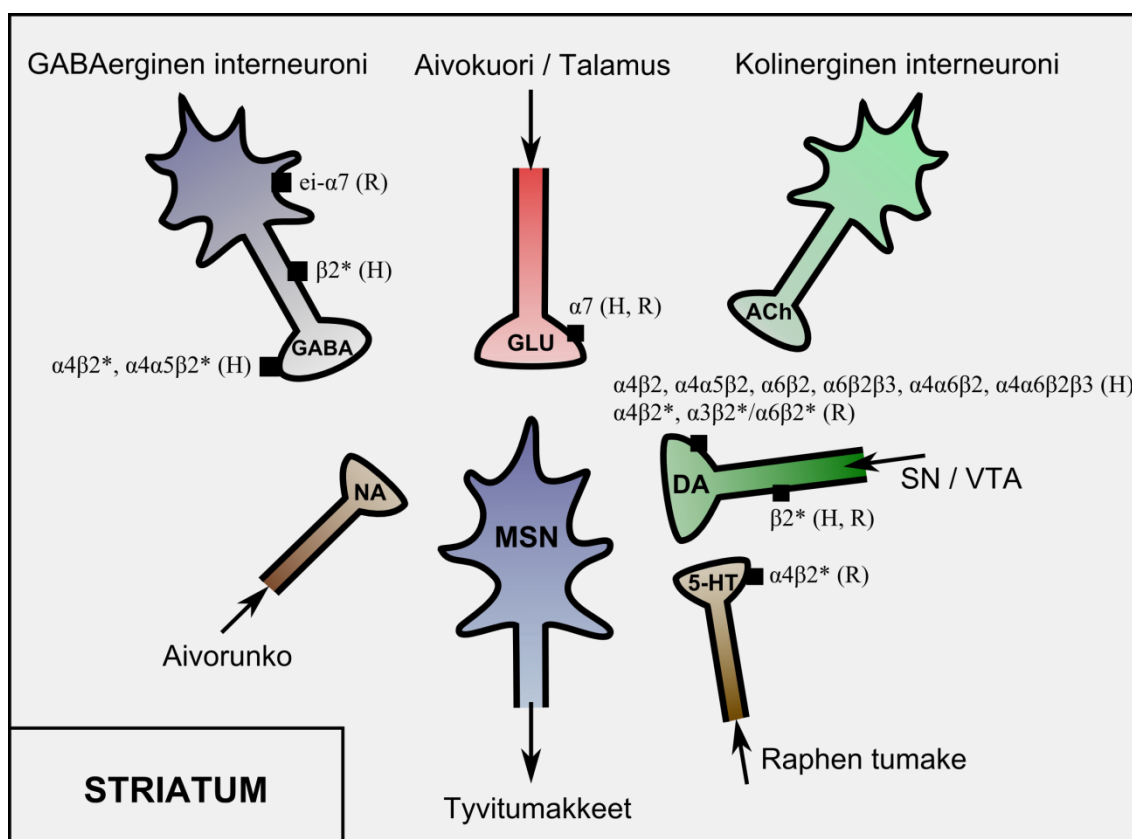
Keskiaivojen raphen tumakkeen serotonergisten hermosolujen hermosyyt vapauttavat serotoniinia myös prefrontaalisen aivokuoren alueella (Dos Santos Coura ja Granon 2012). *In vivo* -mikrodialyysillä mitattu serotoniinin solunulkoinen pitoisuus prefrontaalisella aivokuorella kohoaa systeemisen nikotiiniannostelun jälkeen osittain nikotiinireseptorivälitteisesti, ja paikallisesti annostellut nikotiiniantagonistit estävät vaikutuksen (Rossi ym. 2005). Sen sijaan nikotiiniagonistien kykyä stimuloida [<sup>3</sup>H]serotoniinin vapautumista rotan prefrontaalisesta aivokuoresta valmistetuista aivoleikkeistä tutkineet Rao ym. (2003) havaitsivat, että epibatidiini (100 µM) ei vaikuttanut vapautumiseen ja nikotiinin ja sytisiinin vapautumista stimuloivat vaikutukset ilmaantuivat vasta hyvin korkeilla pitoisuuksilla (30–1000 µM). Nikotiiniagonisti DMPP stimuloi [<sup>3</sup>H]serotoniinin vapautumista, mutta vaikutus ei ollut kalsiumriippuvainen eikä herkkä nikotiiniantagonisteille. Samaan tapaan Reuben ja Clarke (2000) havaitsivat, että nikotiini (≤100 µM) ei stimuloinut [<sup>3</sup>H]serotoniinin vapautumista rotan aivokuoresta valmistetuista synaptosomeista. Näyttöä serotoniinin vapautumista säätelevien nikotiinireseptorien olemassaolosta (prefrontaalisella) aivokuorella ei siis juuri ole lukuunottamatta Rossin ym. (2005) havaintoa nikotiiniantagonistien paikallisista vaikutuksista *in vivo*.

#### 2.4. Yhteenveto ja johtopäätöksiä

Edellä on esitelty asetyylikoliinin nikotiinireseptorit ja niiden rooli välittäjäaineiden vapautumisen säätelijöinä kolmella valitulla aivoalueella (striatum, hippokampus ja prefrontaalinen aivokuori). Kuvissa 4–6 on esitetty katsauksessa käsiteltyjen tutkimustulosten perusteella väistämättäkin epätäydellinen yhteenveto kullakin aivoalueella eri välittäjäaineiden vapautumisen säätelyyn osallistuvista hiiren ja rotan nikotiinireseptoreista. Kuvia laadittaessa on pyritty tarkastelemaan tutkimustuloksia

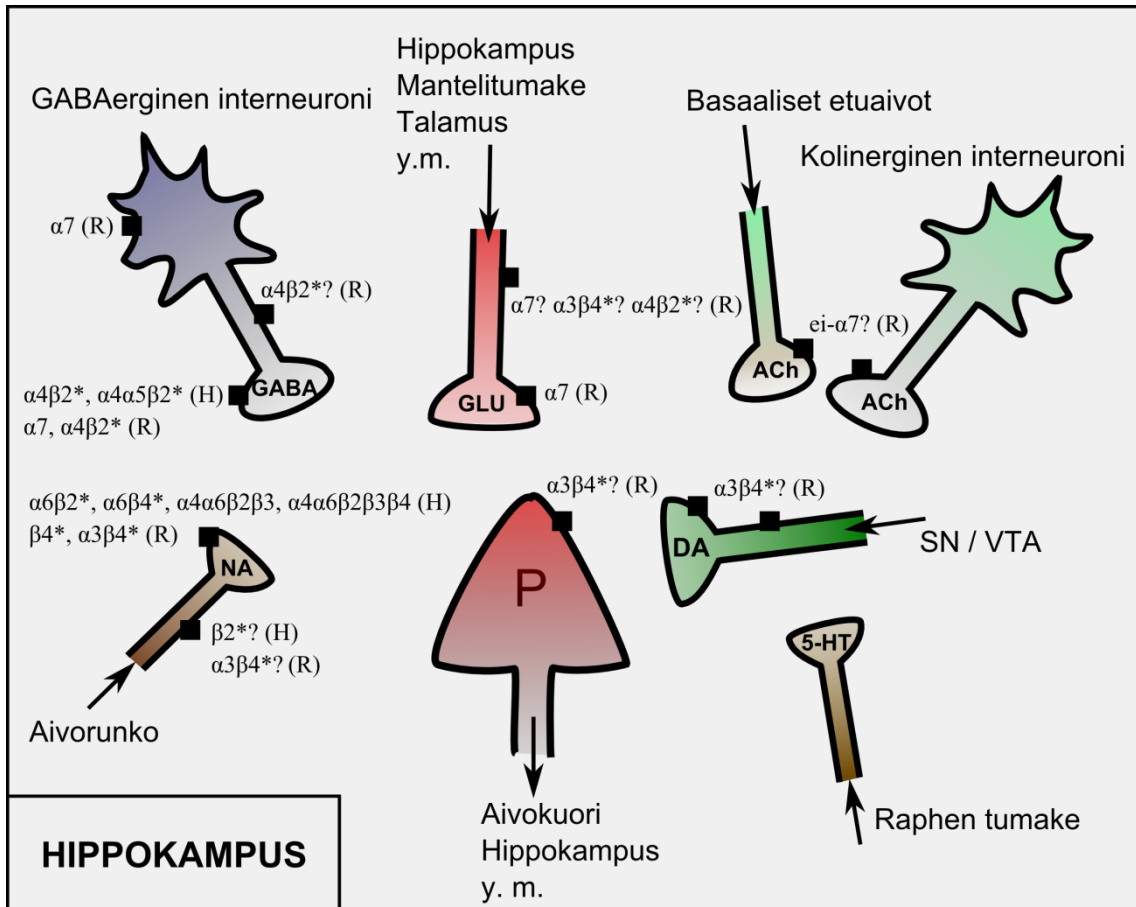
kriittisesti mutta sisällyttämään mahdollisuuksien mukaan myös osittain epäselvät tulokset.

Tarkasteltaessa kirjallisuutta kokonaisuutena voidaan todeta heterogeenisten nikotiini-reseptoripopulaatioiden säätelevän välittäjäaineiden vapautumista kullakin aivoalueella. Erityisesti aivoleiketutkimuksissa, mutta myös joissain synaptosomitutkimuksissa, on havaittu viitteitä presynaptisten nikotiinireseptorien kautta välittyvien vaikutusten lisäksi myös muunlaisista nikotiinireseptoreista. Nämä voivat joko sijaita tutkittavaa välittäjäainetta vapauttavassa hermosolussa preterminaalaisesti, aksonaalisesti tai somatodendriittisesti tai sijaita jossain muussa hermosolussa ja vaikuttaa epäsuorasti



**Kuva 4. Yksinkertaistettu kaavio striatumien välittäjäaineiden vapautumista säätelevistä nikotiinireseptoreista.** Kuvaan on merkitty nikotiinireseptorit, joista on havaittu näyttöä tämän katsauksen esittelemissä tutkimuksissa. Kuvan elementtien keskinäinen järjestys ei kuvasta anatomista järjestystä. H = havaittu hiirellä; R = havaittu rotalla; MSN = striataalinen projektiohermosolu; ACh = asetyylikoliini; DA = dopamiini; GABA =  $\gamma$ -aminovoihappo; GLU = glutamaatti; NA = noradrenaliini; 5-HT = serotoniini; SN = mustatumake; VTA = ventraalinen tegmentum.

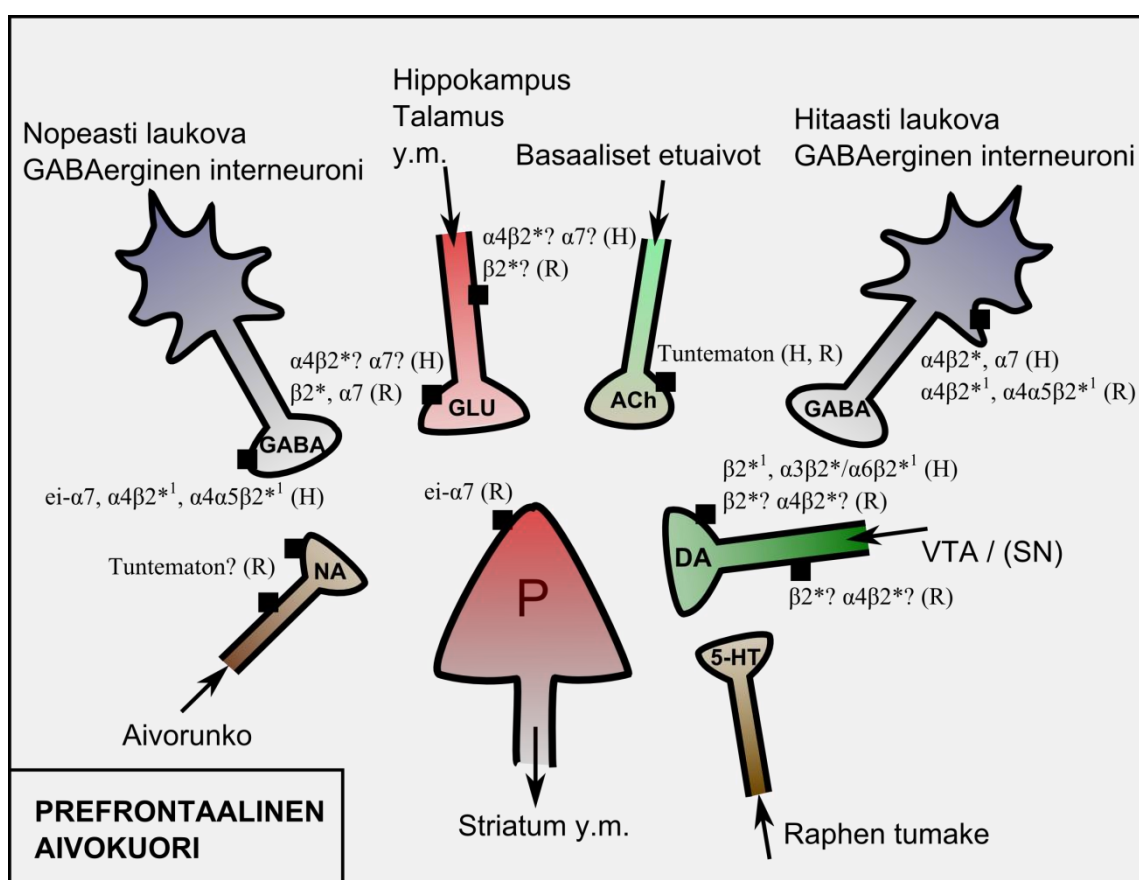




**Kuva 5. Yksinkertaistettu kaavio hippokampuksen välittäjäaineiden vapautumista säätelevistä nikotiinireseptoreista.** Kuvaan on merkitty nikotiinireseptorit, joista on havaittu näyttöä tämän katsauksen esittelemissä tutkimuksissa. Kuvan elementtien keskinäinen järjestys ei kuvasta anatomista järjestystä. Tulokset hippokampuksen eri alueilta on yhdistetty ja pyramidaalisolujen ristikytökset jätetty merkitsemättä selkeyden vuoksi. Kysymysmerkein on ilmaistu reseptorin tarkan sijainnin olevan epäselvä. H = havaittu hiirellä; R = havaittu rotalla; P = pyramidaalisolu; ACh = asetyylikoliini; DA = dopamiini; GABA =  $\gamma$ -aminovoihappo; GLU = glutamaatti; NA = noradrenaliini; 5-HT = serotoniini; VTA = ventraalinen tegmentum; SN = mustatumake.

tutkittavan välittäjäaineen vapautumiseen. Monien tutkimusten tapauksessa ei kuitenkaan ole täysin selvää, mikä on havaittujen ei-presynaptisten nikotiinireseptorien tarkempi sijainti aivoalueella. Tutkimustuloksia tarkasteltaessa presynaptisten reseptorien kautta välittyvien vaikutusten, ei-presynaptisesti sijaitsevien reseptorien roolin ja epäsuorien vaikutusten erottaminen toisistaan on haastavaa ja tutkimusmenetelmästä riippuen usein mahdotonta ilman lisätutkimuksia. Näin ollen usein ei ole mahdollista tehdä varmoja johtopäätöksiä eri soluissa tai solun osissa

sijaitsevien nikotiinireseptorien suhteellisesta merkityksestä. Useassa tapauksessa presynaptisten reseptorien osuus tulee kuitenkin esiin vain synaptosomeissa tai muutoin muista säätelymekanismeista eristettynä, minkä voi katsoa mahdollisesti viittaavan presynaptisten reseptorien suhteellisen vähäiseen rooliin ainakin joillain aivoalueilla ja joissain hermosoluissa. On kuitenkin otettava huomioon, että esimerkiksi tietyllä mekanismilla vapautuneen välittäjäaineen vähäistä määrää toiseen mekanismiin verrattuna ei välttämättä voida suoraan pitää osoituksena siitä, että ensin mainittu mekanismi olisi fysiologisesti merkityksetön.



**Kuva 6. Yksinkertaistettu kaavio prefrontaalisen aivokuoren välittäjäaineiden vapautumista säätelevistä nikotiinireseptoreista.** Kuvaan on merkitty nikotiinireseptorit, joista on havaittu näyttöä tämän katsauksen esittelemissä tutkimuksissa. Kuvan elementtien keskinäinen järjestys ei kuvasta anatomista järjestystä. Pyramidaalisolujen ristikytkökset on jätetty merkittämättä selkeyden vuoksi. Kysymysmerkein on ilmaistu reseptorin tarkan sijainnin olevan epäselvä. H = havaittu hiirellä; R = havaittu rotalla; P = pyramidaalisolu; ACh = asetyylikoliini; DA = dopamiini; GABA =  $\gamma$ -aminovoihappo; GLU = glutamaatti; NA = noradrenaliini; 5-HT = serotoniini; VTA = ventraalinen tegmentum; SN = mustatumake; <sup>1</sup>Havaittu tutkittaessa koko aivokuorta tai etuaivokuorta.

Tutkimustulosten vaihtelevuudesta huolimatta voidaan havaita joitakin yhteneväisyyksiä. Erityisesti mikäli jyrksijöiden tuloksia käsitellään kokonaisuutena, voidaan todeta olevan varsin hyvää näyttöä siitä, että keskushermoston pääasiallisen eksitoivan välittäjäaineen glutamaatin ja pääasiallisen inhiboivan välittäjäaineen GABA:n vapautumista säätelevät kaikilla kolmella aivoalueella sekä presynaptiset että todennäköisesti myös ei-presynaptiset nikotiinireseptorit. Dopamiinin vapautumisen säätelyyn osallistuvat tutkimusnäytön perusteella sekä striatumissa että todennäköisesti myös prefrontaalisella aivokuorella presynaptiset ja mahdollisesti myös ei-presynaptiset nikotiinireseptorit. Lisäksi mainituilla aivoalueilla dopamiinin vapautumista voivat epäsuorasti säädellä muun muassa glutamaatin vapautumista säätelevät nikotiinireseptorit. Hippokampuksessa dopamiinin vapautumisen nikotiinireseptori-välitteistä säätelyä ei sen sijaan ole juurikaan tutkittu. Hippokampuksessa ja prefrontaalisella aivokuorella on vaihtelevasti näyttöä asetyylikoliinin ja noradrenaliinin vapautumista säätelevistä presynaptisista ja ei-presynaptisista nikotiinireseptoreista, mutta striatumissa asetyylikoliinin tai noradrenaliinin vapautumista ei ole tutkittu. Näyttö serotoniinin vapautumisen säätelyyn osallistuvista nikotiinireseptoreista on ristiriitaista ja hyvin vähäistä, ja lähinnä striatumin alueella voidaan todeta todennäköisesti esiintyvän tällaisia presynaptisia nikotiinireseptoreita.

Välittäjäaineiden vapautumisen säätelyyn osallistuvien nikotiinireseptorien alayksikkökoostumus vaihtelee huomattavasti aivoalueiden ja hermosolutyypin välillä. Selkeänä yleissuuntauksena voidaan nähdä lähinnä homomeeristen  $\alpha 7$ -reseptorien rooli vain glutamaatin ja GABA:n vapautumisen säätelyssä. Heteromeeriset reseptorit sen sijaan vaikuttavat säätelevän vaihtelevasti kaikkien välittäjäaineiden vapautumista, siis myös glutamaatin ja GABA:n. Heteromeeristen reseptorien tapauksessa huomiota herättävänä havaintona voi mainita sen, että välittäjäaineiden vapautumista sääteleviä  $\alpha 3\beta 4^*$ -reseptoreita on toistaiseksi löydetty vain rotan hippokampuksesta. Eri lajeilla (rotta, hiiri, ihminen) havaitut nikotiinireseptoripopulaatiot poikkeavat myös usein toisistaan. Monesti tämän voi katsoa mahdollisesti johtuvan eroista tutkimusasetelmissä tai tutkimusmenetelmissä tai yksinkertaisesti siitä, että tiettyä reseptoripopulaatiota on tutkittu tarkemmin tietyssä eläinlajissa. Esimerkiksi poistogeeniset hiiret mahdollistavat huomattavasti rottaa tarkemman reseptorityyppien

karakterisoinnin. Joissain tapauksissa on kuitenkin selkeästi todettavissa eläinlajien välinen ero. Esimerkiksi nikotiiniagonistien stimuloiman hippokampaalisen noradrenaliinin vapautumisen havaittiin samassa tutkimuksessa välittyvän hiirellä valtaosin  $\alpha 6^*$ -reseptorien mutta rotalla ei- $\alpha 6^*$ -reseptorien kautta (Azam ja McIntosh 2006).

Välittäjäaineiden vapautumista säätelevien nikotiinireseptorityyppien karakterisointia vaikeuttaa se, että selektiivisiä ligandeja tunnetaan suhteellisen vähän, ja tunnetutkin ligandit ovat usein vaikeasti saatavilla olevia ja/tai kallisarvoisia yhdisteitä. Esimerkkinä selektiivisten ligandien tarjoamista mahdollisuuksista mainittakoon  $\alpha$ -konotoksiini MII:n mahdollistama kyseiselle yhdisteelle herkkien ( $\alpha 3\beta 2^*/\alpha 6\beta 2^*$ ) ja resistenttien reseptorityyppien farmakologinen erottelu. Tätä menetelmää on sovellettu vain joissain tutkimuksissa, mutta se on paljastanut mielenkiintoisia mahdollisia eroja välittäjäaineiden vapautumista säätelevissä nikotiinireseptoripopulaatioissa esimerkiksi rotan ja hiiren hippokampuksen (Azam ja McIntosh 2006), hiiren striatumin eri osalueiden (Exley ym. 2012) sekä rotan ja hiiren aivokuoren (ks. 2.3.3.2.) välillä. Eri välittäjäaineiden vapautumisen nikotiinireseptorivälitteisessä säätelyssä eri aivoalueilla on runsaasti epäselvyyksiä, joiden tutkimuksessa voisi olla hyötyä paitsi  $\alpha$ -konotoksiini MII:n myös muiden reseptorityypiselektiivisten konotoksiinien käytöstä.

Monet erilaiset, eri hermosoluissa ja eri hermosolujen kohdissa sijaitsevat nikotiinireseptorit säätelevät siis monien välittäjäaineiden vapautumista sekä suoraan että epäsuorasti aivoalueilla, joita pidetään hyvin keskeisinä muun muassa motoristen ja kognitiivisten toimintojen sekä riippuvuuden muodostumisen kannalta. Hyvin vaihtelevien, osin ristiriitaisten ja puutteellisten sekä eri menetelmillä ja eläinlajeilla saatujen tulosten integrointi on kuitenkin haastavaa. Lisää tutkimuksia tarvittaisiin siis nikotiinireseptorien eri alatyypien kautta tapahtuvan välittäjäaineiden vapautumisen karakterisoimiseksi eri aivoalueilla. Lisäksi striatumia koskevassa kirjallisuudessa on usein epäselvää, mitä striatumin osa-alueita on tutkittu. Koska dorsaalisen ja ventraalisen striatumin välillä tiedetään olevan eroja muun muassa nikotiinireseptorien ilmentymisessä, mainittu ongelma vaikeuttaa osaltaan kokonais kuvan hahmottamista. Myös reseptorityyppien monimuotoisuuden fysiologinen merkitys on toistaiseksi

epäselvä (Wonnacott 2008). Hyvin kiintoisana voidaan pitää hypoteesia, jonka mukaan striatumin lukuisat erilaiset dopamiinin vapautumista säätelevät nikotiinireseptorit ja niitä aktivoiva, interneuronien vapauttama asetyylikoliini muodostavat dynaamisen dopamiinin vapautumistodennäköisyyttä säätelevän suotimen, jonka fysiologinen merkitys on dopamiinihermosolujen toonisen ja purskeaktiivisuuden välisen kontrastin korostaminen (Exley ja Cragg 2008). Tämän perusteella herää kysymys, voisiko tällainen merkitys olla yleistettävissä muille aivoalueille, joita hermottavat samat keskiaivojen dopaminergiset alueet, tai muiden välittäjäaineiden vapautumisen säätelyyn. Tätä mahdollisuutta ei kuitenkaan toistaiseksi ole tutkittu.

Välittäjäaineiden vapautumisen nikotiinireseptorivälitteinen säätely keskeisillä aivoalueilla ei ole yllättävä havainto, kun otetaan huomioon nikotiinireseptorien tunnettu rooli useiden sairauksien patofysiologiassa (ks. 2.2.3.). Lukuisia nikotiinireseptoreihin vaikuttavia ja enemmän tai vähemmän reseptorityypiselektiivisiä yhdisteitä on myös pyritty kehittämään kliiniseen käyttöön vaihtelevalla menestyksellä (Jensen ym. 2005; Taly ym. 2009). Nikotiinireseptorien tarkkaa fysiologista merkitystä pohdittaessa tai lääkeaineiden vaikutuskohteita etsittäessä on kuitenkin noudatettava varovaisuutta yleistettäessä jrsijöillä tehtyjen tutkimusten tuloksia ihmiseen. Paitsi rotan ja hiiren välillä, myös jrsijöiden ja kädellisten välillä on havaittu eroja eri reseptorialatyypien ilmenemisessä. Esimerkiksi apinan striatumin dopaminergisissa hermopäätteissä esiintyy hiirestä poiketen myös  $\alpha 3\beta 2^*$ -reseptorityyppiä (Quik ym. 2005; McCallum ym. 2005). Lisäksi ihmisen ja apinankin välillä on todettu olevan eroja nikotiinireseptorityypien ilmentymisessä (Gotti ym. 2006). Ihmisen aivonäytteillä tehdyt välittäjäaineiden vapautumista mitanneet tutkimukset ovat ymmärrettävästi harvinaisia ja tutkineet yksinomaan aivokuorta, ja vaikka tulokset ovat pääosin samansuuntaisia kuin jrsijöillä, ei suppea tutkimustieto mahdollista perusteltujen yleistyksien tekemistä. Monet tutkimukset ovat myös hyödyntäneet poistogeenisiä hiiriä, jotka mahdollistavat huomattavan tarkan tiettyyn vaikutukseen osallistuvien reseptorialatyypien karakterisoinnin. Poistogeenisten hiirten tutkimuksella saatujen tulosten tapauksessa on kuitenkin muistettava kompensatoristen muutosten mahdollisuus, mikä voi teoriassa johtaa sellaisten reseptorityypien syntymiseen, joita ei ilmenny villityypin eläimessä. Lisäksi myös immunosaostuskokeissa on vaarana eri

alayksikköyhdistelmien määrän yliarvioiminen vasta-aineiden rajallisen kapasiteetin ja alayksiköiden kolokalisaation aliarvioimisen johdosta (Exley ja Cragg 2008).

Lopuksi on kiinnitettävä huomiota endogeenisen nikotiinireseptoreita hyödyntävän kolinergisen hermovälityksen ja eksogeenisten (esimerkiksi nikotiinin) vaikutusten erottamiseen. Arvatenkin menetelmällisistä haasteista johtuen vain harvat tutkimukset ovat tutkineet endogeenisen kolinergisen viestinnän vaikutuksia fysiologista ympäristöä muistuttavissa olosuhteissa. Erityisesti nikotiinin tapauksessa on muistettava myös nikotiinin voimakas reseptoreita epäherkistävä vaikutus sekä pitkäkestoisen nikotiinialtistuksen aiheuttamat moninaiset muutokset muun muassa reseptorien ilmentymisessä.

### 3. KOKEELLINEN OSA: Morfiinin stimuloima nikotiinireseptorivälitteinen dopamiinin vapautuminen hiiren striataalisista synaptosomeista

Edellä olevassa kirjallisuuskatsauksessa on pyritty antamaan kohtalaisen kattava yleiskuva asetyylikoliinin nikotiinireseptoreista ja niiden merkityksestä välittäjäaineiden vapautumisen säätelijöinä. Pro gradu -tutkielman kokeellisen osan tarkoituksena sen sijaan oli tutkia tarkemmin yhtä monista mielenkiintoisista nikotiinireseptorien toimintaan liittyvistä ilmiöistä. Tutkimuskohteeksi valittiin nikotiinireseptorien ja opioidien interaktiot ja tarkemmin ottaen morfiinin mahdolliset striatumin dopaminergisten hermopäätteiden presynaptisten nikotiinireseptorien kautta välittyvät vaikutukset dopamiinin vapautumiseen.

#### 3.1. Opioidireseptorit

Toisin kuin ionikanavareseptoreihin kuuluvat nikotiinireseptorit, opioidireseptorit ovat transmembraanisia G-proteiinikytkentäisiä metabotrooppisia reseptoreita (Law ym. 2000; Trescot ym. 2008). Opioidireseptorien endogeenisina ligandeina toimivat erilaiset neuropeptidit ja eksogeenisina ligandeina erilaiset opioidilääkkeaineet, huumausaineet sekä monet kokeelliset opioidiagonistit. Opioidireseptoreita ilmentyy niin

keskushermostossa kuin ääreishermostossakin ja ne jaotellaan kolmeen eri opioidireseptorityyppiin ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ).

Kaikki opioidireseptorityypit välittävät opioidien kipua lievittäviä vaikutuksia, minkä lisäksi opioidireseptorien on todettu liittyvän muun muassa hengityksen, immuunijärjestelmän, suoliston toiminnan ja hormonierityksen säätelyyn (Kieffer ja Gavériaux-Ruff 2002). Osa opioideista on myös riippuvuutta aiheuttavia. Koe-eläimet itseannostelevat  $\mu$ -agonisteja (Van Ree ym. 1978), ja ne aiheuttavat myös ehdollistettua paikkahakuisuutta (Mucha ja Iversen 1984; Shippenberg ym. 1993; Piepponen ym. 1997). Lisäksi koe-eläimet itseannostelevat kallonsisäisesti ventraaliseen tegmentumiin myös  $\delta$ -agonisteja (Devine ja Wise 1994).  $\kappa$ -agonistit sen sijaan aiheuttavat ehdollistettua paikka-aversiota (Mucha ja Herz 1985; Shippenberg ym. 1993).

### 3.2. Opioidi-nikotiini-interaktiot

Vaikka hermoston nikotiinireseptorit ja opioidireseptorit poikkeavat toisistaan suuresti rakenteeltaan ja toimintaperiaatteeltaan ja kumpiakin aktivoivat niiden omat endogeeniset ligandit, paljon todistusaineistoa on kerätty myös opioidi-nikotiini-interaktioista. Nikotiinin on osoitettu lisäävän endogeenisten opioidien ilmentymistä jyrksijän keskushermostossa, muun muassa striatumissa (Dhatt ym. 1995; Houdi ym. 1998). Kroonisen nikotiinikäsittelyn on todettu herkistävän jyrksijöitä morfiinin lokomotorista aktiivisuutta lisäävälle vaikutukselle (Biala ja Weglinska 2004; Vihavainen ym. 2006). Hiirelle annosteltu nikotiini paitsi lievittää kipua itsessään osittain  $\mu$ -reseptorivälitteisesti myös tehostaa morfiinin kipua lievittävää vaikutusta, minkä lisäksi molemmat yhdisteet aiheuttavat ristitoleranssia toisiaan vastaan (Zarrindast ym. 1997; Zarrindast ym. 1999; Berrendero ym. 2002). Toisaalta nikotiiniantagonistin annostelu rotan accumbens-tumakkeeseen estää morfiinin kipua lievittävän vaikutuksen (Schmidt ym. 2001).

Monet tutkimukset ovat havainneet interaktioita myös nikotiinin ja opioidien riippuvuutta aiheuttavien vaikutusten välillä. Kliinisissä tutkimuksissa opioidiagonistien on todettu lisäävän lisäävän tupakointia (Pomerleau 1998). Nikotiinin aiheuttaman

ehdollistetun paikkahakuisuuden on poistogeenisillä hiirillä osoitettu riippuvan kriittisesti  $\mu$ -reseptoreista (Berrendero ym. 2002). Kroonisen nikotiinikäsittelyn on myös osoitettu herkistävän koe-eläimen morfiinin ehdollistettua paikkahakuisuutta aiheuttavalle vaikutukselle (Shippenberg ym. 1996; Biala ja Weglinska 2004; Vihavainen ym. 2008a), minkä lisäksi morfiini ja nikotiini aiheuttavat paikkahakuisuuskokeissa ristitoleranssia toisiaan vastaan (Zarrindast ym. 2003).

Keskiaivojen dopaminergisten hermoratojen, erityisesti ventraalisen tegmentumin ja accumbens-tumakkeen välisen mesolimbisen radan, on osoitettu olevan keskeisessä osassa riippuvuutta aiheuttavien vaikutusten välittymisessä sekä nikotiinin (Maskos ym. 2005; David ym. 2006; Besson ym. 2012) että opioidien (Phillips ja LePiane 1980; Bals-Kubik ym. 1993; Shippenberg ym. 1993; Devine ja Wise 1994) tapauksessa. Näin ollen ei ole yllättävää, että monet tutkimukset ovat kuvanneet nimenomaisesti dopaminergisten aivoalueiden kautta välittyviä opioidi-nikotiini-interaktioita. Esimerkiksi morfiinin stimuloiman dopamiinin vapautumisen on todettu tehostuvan rotan dorsaalissa ja ventraalisessa striatumissa kroonisen nikotiinialistuksen jälkeen (Vihavainen ym. 2008b). Lisäksi paikallisesti rotan ventraaliseen tegmentumiin annosteltuna  $\mu$ -agonisti vähentää nikotiinin itseannostelua (Corrigall ym. 2000),  $\mu$ -antagonisti estää sekä morfiinin että nikotiinin systeemisen annostelun stimuloimaa dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa (Tanda ja Di Chiara 1998), ja nikotiini herkistää morfiinin ehdollistettua paikkahakuisuutta aiheuttavalle vaikutukselle (Rezayof ym. 2007). Rotan accumbens-tumakkeeseen annostellun  $\kappa$ -agonistin puolestaan on havaittu herkistävän nikotiinin vieroitusoireille (Tejeda ym. 2012). Nikotiinin ja opioidien neurokemiallisten vaikutusten tutkimus onkin paljastanut niillä olevan toisiaan muistuttavia ja osittain samojen hermosolujen kautta välittyviä vaikutuksia dopaminergiseen hermovälitykseen.

### 3.3. Opioidien vaikutukset dopamiinin vapautumiseen striatumissa

Sekä keskiaivojen dopaminergisilla alueilla että striatumissa ilmentyy vaihtelevassa määrin kaikkien kolmen eri tyypin opioidireseptoreita (Mansour ym. 1988). Systemisesti tai keskiaivoihin annosteltuna  $\mu$ -agonistit lisäävät dopamiinin



vapautumista *in vivo* rotan dorsaalissa striatumissa ja accumbens-tumakkeessa (Di Chiara ja Imperato 1986; Di Chiara ja Imperato 1988b; Spanagel ym. 1990; Spanagel ym. 1992; Piepponen ym. 1999a), ja hiirellä valtaosa vastaavasta vaikutuksesta häviää  $\mu$ -reseptorin geneettisen poistamisen johdosta (Chefer ym. 2003). Myös  $\delta$ -agonisti voi lisätä dopamiinin vapautumista rotan accumbens-tumakkeessa kallonsisäisesti annosteltuna (Spanagel ym. 1990), joskaan  $\delta$ -reseptorin geneettinen poistaminen ei vähentänyt morfiinin stimuloimaa dopamiinin vapautumista hiiren accumbens-tumakkeessa (Chefer ym. 2003). Systemisesti annostellut  $\kappa$ -agonistit sen sijaan vähentävät dopamiinin vapautumista *in vivo* rotan dorsaalissa ja ventraalisessa striatumissa (Di Chiara ja Imperato 1988a; Di Chiara ja Imperato 1988b; Spanagel ym. 1990; Tejada ym. 2012).

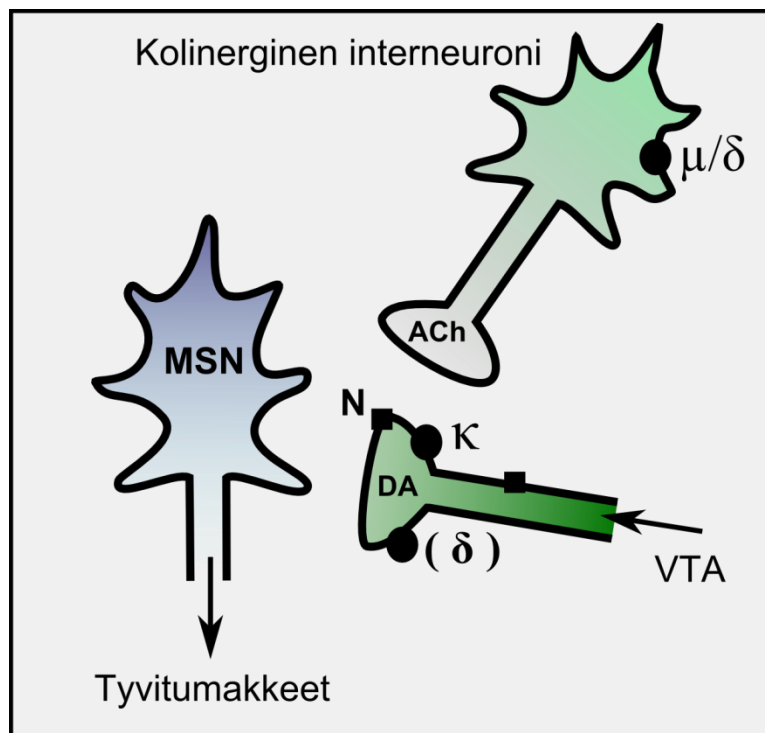
$\mu$ -opioidien keskiaivojen kautta välittyvän striataalista dopamiinin vapautumista lisäävän vaikutuksen uskotaan olevan luonteeltaan epäsuora. Keskiaivojen dopaminergisilla alueilla  $\mu$ -agonistit vähentävät GABA:n vapautumista interneuroneista (Lacey ym. 1989; Johnson ja North 1992; Sotomayor ym. 2005), minkä on esitetty johtavan dopaminergisten hermosolujen disinhibitiioon ja dopamiinin vapautumisen lisääntymiseen striatumissa (Johnson ja North 1992). Striatumissa puolestaan ilmentyy runsaasti kaikkia kolmea opioidireseptorityyppiä (Mansour ym. 1988), mutta niiden osuus dopamiinin vapautumisen säätelyssä on jokseenkin epäselvä viitaten mahdollisesti useiden ja ainakin osittain epäsuorien mekanismien osallistumiseen. Opioidien paikalliset vaikutukset myös vaihtelevat striatumin osa-alueesta riippuen, ja tutkimustulokset ovat osittain ristiriitaisia.

Rotan accumbens-tumakkeeseen annostellut  $\mu$ -agonistit lisäävät dopamiinin vapautumista *in vivo* (Yoshida ym. 1999; Hirose ym. 2005; Okutsu ym. 2006), joskin tumakkeen kuorikerroksessa on havaittu myös dopamiinin vapautumista vähentävä vaikutus (Hipólito ym. 2008). Sen sijaan dorsaaliseen striatumiin annosteltuna  $\mu$ -agonistit vähentävät dopamiinin vapautumista *in vivo* (Pentney ja Gratton 1991; Piepponen ym. 1999b). *In vitro*  $\mu$ -agonistien puolestaan on havaittu vähentävän dopamiinin vapautumista rotan striataalisista aivoleikkeistä (Westfall ym. 1983; Schlösser ym. 1995), eikä  $\mu$ -agonisteilla ollut vaikutusta [ $^3$ H]dopamiinin vapautumiseen

rotan striataalisista synaptosomeista (Ronken ym. 1993). Lisäksi Britt ja McGehee (2008) havaitsivat rotan accumbens-tumakkeen kuorikerroksessa (mutta ei dorsaaliosassa striatumissa)  $\mu$ -reseptorivälitteisen, sähköisesti stimuloitua dopamiinin vapautumista vähentävän vaikutuksen.  $\mu$ -agonistien paikallisten striataalista dopamiinin vapautumista säätelevien vaikutusten uskotaan välittyvän epäsuorasti, sillä striatumin dopamiinihermopäätteissä ei todennäköisimmin sijaitse presynaptisia  $\mu$ -reseptoreita (Trovero ym. 1990; Britt ja McGehee 2008).

Pienessä osassa dorsaalisen ja ventraalisen striatumin dopaminergisia hermopäätteitä on todettu esiintyvän presynaptisia  $\delta$ -reseptoreita (Trovero ym. 1990; Svingos ym. 1999).  $\delta$ -agonistien paikallisen annostelun on havaittu tehostavan dopamiinin vapautumista *in vivo* sekä dorsaaliosassa että ventraalisessa striatumissa (Pentney ja Gratton 1991; Hirose ym. 2005; Hipólito ym. 2008).  $\mu$ -agonistien tapaan myös  $\delta$ -agonisteilla on havaittu dopamiinin vapautumista vähentävä vaikutus rotan striataalisissa aivoleikkeissä (Westfall ym. 1983; Schlösser ym. 1995; Britt ja McGehee 2008) mutta ei vaikutusta [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumiseen rotan striataalisista synaptosomeista (Ronken ym. 1993); toisaalta myös dopamiinin vapautumista aivoleikkeistä stimuloiva vaikutus on kuvattu (Lubetzki ym. 1982).  $\kappa$ -reseptoreita puolestaan on havaittu sijaitsevan suurella osalla dopamiinihermopäätteitä ainakin accumbens-tumakkeen alueella (Svingos ym. 2001a).  $\kappa$ -agonistit vähentävät dopamiinin vapautumista rotan accumbens-tumakkeessa paikallisesti annosteltuna *in vivo* (Spanagel ym. 1992), rotan striataalisista aivoleikkeistä (Schlösser ym. 1995; Britt ja McGehee 2008) ja myös rotan striataalisista synaptosomeista (Ronken ym. 1993).

Tähänastisen tutkimustiedon perusteella Britt ja McGehee (2008) ovat esittäneet mallin opioidien vaikutuksista accumbens-tumakkeessa (Kuva 7). Mallin mukaan accumbens-tumakkeen kolinergisten interneuronien  $\mu$ - ja  $\delta$ -reseptorien aktivaatio johtaa asetylikoliinin vapautumisen vähentymiseen, dopamiinihermopäätteiden presynaptisten nikotiinireseptorien aktivaation vähentymiseen ja tämän myötä dopamiinin vapautumisen vähentymiseen. Presynaptiset  $\kappa$ -reseptorit puolestaan inhiboivat dopamiinin vapautumista suoraan dopamiinihermopäätteissä. Dopamiinin



**Kuva 7. Kaavakuva accumbens-tumakkeen dopamiinin vapautumiseen osallistuvista opioidireseptoreista.** Kolinergisen interneuronin  $\mu$ - ja  $\delta$ -opioidireseptorit inhiboivat asetyylikoliinin (ACh) vapautumista. Tämä johtaa puolestaan epäsuorasti dopamiinin (DA) vapautumisen vähentymiseen dopamiinihermopäätteen presynaptisten nikotiinireseptorien (N) aktivaation vähentyessä. Presynaptiset  $\kappa$ -opioidireseptorit inhiboivat dopamiinin vapautumista suoraan. Kuva on laadittu Brittin ja McGeheen (2008) esittämän mallin mukaisesti. Kuvaan on lisätty myös pienessä osassa dopaminergisia hermopäätteitä esiintyvät presynaptiset  $\delta$ -opioidireseptorit (Svingos ym. 1999), joiden vaikutus dopamiinin vapautumiseen on epäselvä. MSN = Striatumin GABAerginen projektihermosolu. VTA = ventraalinen tegmentum

striataalista vapautumista *in vivo* lisäävien opioidivaikutusten selitykseksi esitettiin dopamiinin vapautumisen vähentymisen aiheuttamaa dopaminergisen hermoverkon aktiivisuuden muuttumista purskeaktiivisuuden suuntaan. Jälkimmäistä tukeva havainto oli  $\mu$ - ja  $\delta$ -agonistien kyky inhiboida accumbens-tumakkeen kuorikerroksessa erityisesti yksittäisten sähköisten ärsykkeiden mutta ei purskeärsykkeiden stimuloimaa dopamiinin vapautumista (Britt & McGehee 2008). Erityisen kiintoisaksi tämän havainnon tekee se, että sekä kyseisessä että aiemmissa tutkimuksissa (Zhou ym. 2001; Rice ja Cragg 2004; Zhang ja Sulzer 2004) nikotiinilla on havaittu olevan samankaltainen vaikutus. Brittin ja McGeheen (2008) mallin mukaan  $\mu/\delta$ -opioidien ja nikotiinin vaikutukset välittyvätkin viime kädessä samojen dopaminergisten hermopäätteiden presynaptisten

nikotiinireseptorien kautta, nikotiinin epäherkistäessä reseptoreita ja opioidien vähentäessä reseptoreita aktivoivan endogeenisen asetyylikoliinin vapautumista. On kuitenkin kyseenalaista, voidaanko mallia yleistää koskemaan myös dorsaalista striatumia tai edes koko accumbens-tumaketta, sillä opioideilla ei havaittu olevan vaikutuksia dorsaalisisissa striatumissa eikä valtaosin myöskään accumbens-tumakkeen ytimessä.

#### 3.4. Reseptoritason opioidi-nikotiini-interaktiot ja tutkimuksen tavoitteet

Opioidien ja nikotiinin osittain toisiaan muistuttavat vaikutukset ja moninaiset interaktiot ovat herättäneet kysymyksen myös mahdollisista suorista reseptoritason vuorovaikutuksista. Viitteitä tästä on havaittu morfiinin rakenneanalogi dekstrometorfaania tutkineissa kokeissa. Dekstrometorfaanin on todettu estävän kilpailemattomasti ihmisen solulinjassa ilmentyvän  $\alpha 3\beta 4$ -nikotiinireseptorin aktivaation stimuloimaa  $^{86}\text{Rb}^+$ -effluksia ja sähköistä aktiivisuutta (Hernandez ym. 2000) sekä *Xenopus*-sammakon munasoluissa ilmentyvien  $\alpha 3\beta 4$ -,  $\alpha 4\beta 2$ - ja  $\alpha 7$ -reseptorien aktivaation stimuloimaa sähköistä aktiivisuutta (Damaj ym. 2005). Opioidi-antagonisteista puolestaan naloksonin on todettu estävän nikotiinin stimuloimaa katekoliamiinivapautumista ja sähköistä aktiviteettia naudan kromaffiinisoluissa (Tomé ym. 2001) ja naltreksonin inhiboivan  $\alpha 4\beta 2$ - ja  $\alpha 7$ -reseptoreita rotan hippokampaalisissa hermosoluissa (Almeida ym. 2000).

Asian lisäselvittämiseksi Talka ym. (2013) tutkivat hiljattain morfiinin nikotiinireseptoreihin kohdistuvia vaikutuksia hyödyntäen ihmisen transfektoituja  $\alpha 4\beta 2$ - ja  $\alpha 7$ -reseptoreita ilmentäviä ihmisen epiteelisolulinjoja sekä luonnostaan  $\alpha 3^*$ - ja  $\alpha 7$ -reseptoreita ilmentävää ihmisen neuroblastoomasolulinjaa. Sitoutumiskokeissa morfiinin havaittiin syrjäyttävän [ $^3\text{H}$ ]epibatidiinin kaikissa solulinjoissa, joskin vaadittavat morfiinipitoisuudet olivat useaa kertaluokkaa suurempia kuin tarvittavat nikotiinipitoisuudet. Kiintoisasti morfiinin sitoutumiskokeilla kyettiin nikotiinin tapaan erottelemaan neuroblastoomasolujen kaksi eri nikotiinireseptoripopulaatiota. Morfiinin kyky aktivoida nikotiinireseptoreita osoitettiin kokeilla, joissa sekä nikotiini että morfiini stimuloivat annosriippuvaisesti  $^{86}\text{Rb}^+$ -effluksia  $\alpha 4\beta 2$ -reseptoreita ilmentävistä

soluista ja mekamyylamiini estä morfiinin vaikutuksen. Lisäksi morfiinilla oli pienten nikotiinipitoisuuksien stimuloimaa  $\alpha 4\beta 2$ -välitteistä effluksia tehostava mutta suurten nikotiinipitoisuuksien stimuloimaa  $\alpha 4\beta 2$ -välitteistä effluksia vähentävä vaikutus. Näin ollen morfiinin pääteltiin toimivan osittaisena agonistina  $\alpha 4\beta 2$ -nikotiinireseptoreissa. Sen sijaan morfiini ei stimuloinut  $^{86}\text{Rb}^+$ -effluksia neuroblastoomasoluista ja estä nikotiinin stimuloimaa effluksia annosriippuvaisesti. Tästä pääteltiin morfiinin toimivan  $\alpha 3^*$ -reseptoreissa antagonistisesti. Lisäksi havaittiin viitteitä siitä, että naloksoni ja naltreksoni voivat toimia  $\alpha 4\beta 2$ -reseptorien antagonistina.

Kun otetaan huomioon monet havaitut opioidi-nikotiini-interaktiot, opioidien monipuoliset ja osin epäselvät vaikutukset striataaliseen dopamiinihermovälitykseen, presynaptisten nikotiinireseptorien ilmeisen kriittinen osuus striataalisen dopamiinivapautumisen säätelyssä (ks. 2.3.1.2.), opioidien dopaminergista aktiivisuutta muuttavien vaikutusten mahdollinen välittyminen osittain presynaptisten nikotiinireseptorien kautta (Britt ja McGehee 2008) sekä lopulta edellä kuvatut morfiinin ja nikotiinireseptorien interaktioihin viittaavat tulokset (Talka ym. 2013), voidaan perustellusti esittää hypoteesi opioidien mahdollisesta suoraan presynaptisten nikotiinireseptorien kautta välittyvästä dopamiinin vapautumista säätelevästä vaikutuksesta. Mahdollinen nikotiinireseptorien aktivointi muodostaisi luonnollisesti vain osan opioidien vaikutuksesta, ja morfiinin heikon nikotiinireseptoriaffiniteetin (Talka ym. 2013) perusteella mahdollisen vaikutuksen voitaisiin olettaa ainakin *in vivo* olevan suhteellisen vähäinen verrattuna opioidireseptorien kautta välittyviin vaikutuksiin. Asian lisäselvittäminen on kuitenkin mahdollista *in vitro*, ja erityisen tarpeellista olisi tutkia lisää opioidien luonnollisesti ilmentyviin nikotiinireseptoreihin kohdistuvia vaikutuksia. Tähän soveltuvat erinomaisesti erilaiset synptosomi-perfuusiomenetelmät, joiden avulla voidaan muun muassa minimoida mahdollisten epäsuorien vaikutusten osuus (Raiteri ja Raiteri 2000).

Edellä esitetyn hypoteesin tutkimiseksi selvitettiin opioidien mahdollisia presynaptisten nikotiinireseptorien kautta välittyviä vaikutuksia radioleimatun dopamiinin vapautumiseen hiiren striatumin aivokudoksesta valmistetuista synaptosomeista. Tutkimuksessa käytettiin Helsingin yliopiston Farmasian tiedekunnan Farmakologian ja

toksikologian osaston uutta synaptosomiperfuusiolaitteistoa. Laitteiston avulla perfusoituja [<sup>3</sup>H]dopamiinia sisältäviä synaptosomeja voidaan käsitellä agonisteilla ja antagonisteilla, ja synaptosomeista käsittelyn jälkeen vapautuneen [<sup>3</sup>H]dopamiinin määrä voidaan mitata radioaktiivisuuden perusteella. Samaa menetelmää on aiemmin käytetty muun muassa striatumin dopaminergisten hermopäätteiden nikotiinireseptorien alayksikkökoostumuksen ja farmakologisten ominaisuuksien karakterisointiin poistogeenisillä hiirillä (Salminen ym. 2004; Salminen ym. 2007). Salmisen ym. tutkimuksissa dopamiinin vapautumisen säätelyyn todettiin hiiren striatumissa osallistuvan ainakin kuusi eri presynaptista heteromeeristä nikotiinireseptoryyppiä, kun taas  $\alpha 7$ -reseptorit eivät osallistu vapautumisen säätelyyn suoraan hermopäätteissä. Tässä tutkimuksessa synaptosomit valmistettiin Salmisen ym. (2004) tutkimuksia vastaavalla tavalla kudospäätteistä, jotka oli otettu valtaosin hiiren striatumin dorsaaliosasta kuitenkin tarkemmin määrittämättä dorsaalisen ja ventraalisen striatumin eroa. Sama valmistustapa helpottaa tutkimusten tulosten vertailua ja menetelmän toimivuuden varmistamista. Toisaalta suurin osa opioidien neurokemiallisia vaikutuksia selvittäneistä tutkimuksista on kohdistunut ventraaliseen striatumiin, mikä vaikeuttaa mahdollisten opioidien koskevien tulosten vertailua aiempiin tutkimustuloksiin.

Tutkittaviksi agonisteiksi valittiin nikotiini ja morfiini. Nikotiinin stimuloiman [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen karakterisointi oli tärkeä osa tutkimusta ensinnäkin menetelmän toimivuuden varmistamiseksi. Tähän pyrittiin vertaamalla tuloksia pääosin vastaavalla laitteistolla ja vastaavin toimintatavoin tehdyn tutkimuksen tuloksiin (Salminen ym. 2004). Lisäksi pyrittiin saamaan vertailukohteita mahdollisille opioidituloksille. Morfiinin puolestaan voidaan katsoa olevan prototyyppinen ja suhteellisen selektiivinen  $\mu$ -opioidiagonisti (Trescot ym. 2008), joten sen vaikutusten kartoittaminen oli looginen ensiaskel. Mikäli morfiini kykenee aktivoimaan dopaminergisten hermopäätteiden presynaptisia nikotiinireseptoreita, odotettu vaikutus olisi nikotiinin vaikutusta muistuttava [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen lisääntyminen. Agonistien [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista stimuloivia vaikutuksia pyrittiin lisäksi inhiboimaan valituilla nikotiiniantagonisteilla ja näin saamaan lisänäyttöä morfiinin mahdollisten vaikutusten välittymisestä nikotiinireseptorien kautta. Erilaisen

affiniteetti-profiilin omaavilla antagonisteilla pyrittiin myös saamaan lisätietoa agonistien vaikutusten taustalla olevista nikotiinireseptoripopulaatioista. Tutkittaviksi nikotiiniantagonisteiksi valittiin, vastaavasti kuin Salmisen ym. (2004) tutkimuksessa, dihydro- $\beta$ -erytroidiini (DH $\beta$ E), metyylilykakonitiini (MLA) ja  $\alpha$ -konotoksiini MII ( $\alpha$ -CTX MII). DH $\beta$ E salpaa mikromolaarisilla pitoisuuksilla pääasiassa heteromeerisiä nikotiinireseptoreita ja on jokseenkin selektiivinen  $\alpha 4^*$ - ja  $\beta 2^*$ -reseptorien suhteen (Chavez-Noriega ym. 1997). MLA salpaa  $\alpha 7$ -reseptoreita jo nanomolaarisilla pitoisuuksilla mutta mikromolaarisilla pitoisuuksilla myös heteromeerisiä reseptoreita (Davies ym. 1999; Mogg ym. 2002; Jensen ym. 2005).  $\alpha$ -CTX MII puolestaan salpaa selektiivisesti ja suurella affiniteetilla sekä  $\alpha 3\beta 2^*$ - että  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptorityyppejä (Cartier ym. 1996; Kuryatov ym. 2000; Champtiaux ym. 2002), joista  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptoreita esiintyy hiiren striatumissa (Whiteaker ym. 2002).

Nikotiiniantagonistien lisäksi tutkittiin myös opioidiantagonisti naloksonin mahdollisia vaikutuksia [ $^3$ H]dopamiinin vapautumiseen. Tutkimalla naloksonin vaikutusta morfiinin stimuloimaan vapautumiseen pyrittiin selvittämään opioidireseptorien osuutta dopamiinin vapautumisessa. Toisaalta mahdollisena pidettiin myös sitä, että naloksonilla saattaisi olla nikotiinireseptorien kautta välittyviä inhiboivia vaikutuksia, sillä sen on havaittu voivan toimia  $\alpha 4\beta 2$ -nikotiinireseptorin antagonistina (Talka ym. 2013). Tämän selvittämiseksi tutkittiin naloksonin vaikutusta myös nikotiinin stimuloimaan [ $^3$ H]dopamiinin vapautumiseen.

Agonistien stimuloima [ $^3$ H]dopamiinin vapautuminen pyrittiin myös jaottelemaan kahteen komponenttiin  $\alpha$ -konotoksiini MII ( $\alpha$ -CTX MII) -esikäsitellyn avulla. Nikotiinin hiiren striataalisista synaptosomeista stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen on osoitettu välittyvän kahden farmakologisesti eroteltavissa olevan reseptoripopulaation kautta, joista toinen on herkkä  $\alpha$ -CTX MII:n inhiboivalle vaikutukselle ( $\alpha 6\beta 2^*$ ) mutta toinen ei ( $\alpha 4\beta 2^*$ ; Salminen ym. 2004). Tässä tutkimuksessa nikotiinin stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen odotettiin niin ikään olevan osittain herkkä  $\alpha$ -CTX MII:lle. Lisäksi odotettiin aiempia tuloksia (Salminen ym. 2004) vastaten  $\alpha$ -CTX MII -herkän komponentin olevan herkempi nikotiinin stimuloivalle vaikutukselle ja MLA:n inhiboivalle vaikutukselle, ja  $\alpha$ -CTX

MII -resistentin komponentin olevan herkempi DH $\beta$ E:n inhiboivalle vaikutukselle. Tutkimalla  $\alpha$ -CTX MII -esikäsittelyn vaikutusta morfiinin stimuloimaan [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumiseen pyrittiin selvittämään, välittykö mahdollinen morfiinin nikotiinireseptoreihin kohdistuva vaikutus myös kahden erillisen reseptoripopulaation kautta ja mikäli näin on, onko eri reseptoripopulaatioita heijastavien vapautumisen komponenttien välillä havaittavissa vastaavia farmakologisia eroja kuin nikotiinilla.

#### 4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

##### 4.1. Materiaalit

Tutkimuksessa käytetyt materiaalit toimittajineen on lueteltu seuraavassa. Askorbiinihappo, atropiinisulfaattimonohydraatti, D-(+)-glukoosi, 4-(2-hydroksietyyli)-piperatsiini-1-etaanisulfonihappo (HEPES), kaliumdivetyfosfaatti, magnesiumsulfaatti-heptahydraatti, metyyliylkakonitiinisitraattihydraatti, naloksonihydroklorididihydraatti, naudan seerumin albumiini, (–)-nikotiinivetytartraatti, nomifensiinimaleaatti, pargyliinihydrokloridi: Sigma-Aldrich, St. Louis MO, Yhdysvallat. Dihydro- $\beta$ -erytroidiinihydrobromidi: Tocris, Ellisville MO, Yhdysvallat. 3,4-[2,5,6-<sup>3</sup>H]-dihydroksifenyylietyyliamiini ([<sup>3</sup>H]dopamiini): PerkinElmer, Waltham MA, Yhdysvallat. HEPES, natriumsuola: GenScript, Piscataway NJ, Yhdysvallat. Kaliumkloridi, natriumkloridi, sukroosi: Merck, Darmstadt, Saksa. Kalsiumkloridi: Merck Eurolab, Espoo, Suomi. Morfiinihydrokloridi: Yliopiston Apteekki, Helsinki, Suomi. Puhdistettu vesi valmistettiin Millipore Simplicity -puhdistuslaitteella (vastus 18,2 M $\Omega$ ·cm; EMD Millipore, Billerica MA, Yhdysvallat).  $\alpha$ -konotoksiini MII saatiin ystävällisenä lahjoituksena J.M. McIntoshilta (Utahin yliopisto, Yhdysvallat).

##### 4.2. Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytettiin 30–90 vuorokauden ikäisiä C57BL/6JRccHsd-kannan naarashiiriä (Harlan Laboratories, Indianapolis IN, Yhdysvallat). Koe-eläinten ylläpito ja suoritettavat kokeet noudattivat eurooppalaista yleissopimusta kokeellisiin ja muihin



tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien selkärankaisten eläinten suojelemiseksi. Eläimiä pidettiin korkeintaan 10 hiirtä häkkiä kohden ScanTainer-laitteessa (Scanbur Technology, Karlsunde, Tanska) 20–22 °C lämpötilassa huoneessa, jossa ylläpidettiin 12h/12h valo-pimeäsykliä. Eläimille oli tarjolla ruokaa (Teklad Global; Harlan Laboratories, Indianapolis IN, Yhdysvallat) ja vesijohtovettä *ad libitum*.

### 4.3. Tutkimusmenetelmä

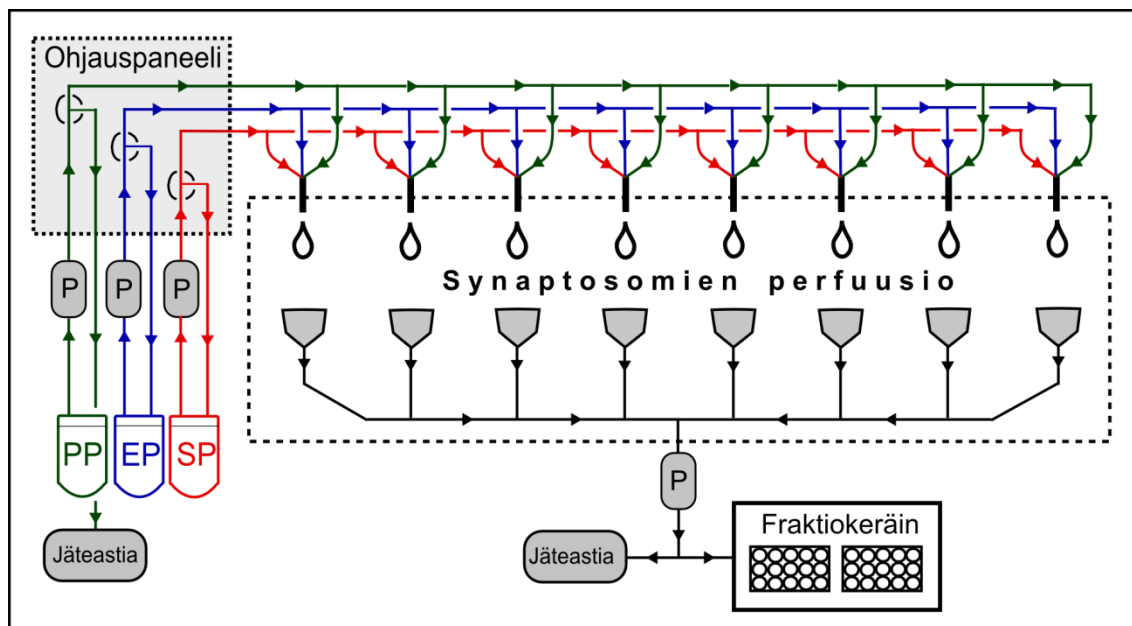
#### 4.3.1. Synaptosomiperfuusiolaitteiston toimintaperiaate

Tutkimuksessa käytettiin koe-eläinten aivonäytteistä homogenisoinnilla valmistettuja synaptosomeja eli eristettyjä mutta rakenteensa ja toiminnallisuutensa pääosin säilyttäviä hermopäätteitä (Whittaker ym. 1964; Raiteri ja Raiteri 2000). Tutkimuksen suorittamista varten Helsingin yliopiston Farmasian tiedekunnan Farmakologian ja toksikologian osaston isotooppilaboratorion tiloihin rakennettiin synaptosomiperfuusiolaitteisto. Laitteiston tarkoituksena on mahdollistaa synaptosominäytteistä erilaisten käsittelyjen seurauksena vapautuvan radioleimatun välittäjäaineen määrittäminen. Kuvassa 8 on esitetty kaavakuva laitteiston toimintaperiaatteesta. Laitteisto vastaa pääperiaatteiltaan Coloradon yliopiston tutkimuksissa käytettyjä laitteistoja, ja Coloradon yliopiston tutkijat avustivat laitteiston osien hankkimisessa ja laitteiston suunnittelussa. Laitteiston kokosivat Outi Salminen ja tämän tutkielman kirjoittaja, minkä lisäksi kokoamisessa avusti Fatima Ahmetlić.

Laitteisto koostuu vesihauteesta (VWR WB6; VWR International, Radnor PA, Yhdysvallat), jossa suoritetaan radioleimatun välittäjäaineen sisäänotto synaptosomeihin; kahdeksasta muovisesta suodatinpidikkeestä (PALL Life Sciences, Ann Arbor MI, Yhdysvallat), joilla oleville suodatinpapereille (lasikuitua, huokoskoko 1 µm; PALL Life Sciences) radioleimattua välittäjäainetta sisältävät synaptosomit pipetoidaan kokeen ajaksi; neljästä peristalttisesta pumpusta (Gilson Minipuls 3; Gilson, Middleton WI, Yhdysvallat), joista kolme on tarkoitettu puskuriliuosten johtamiseen suodatinpidikkeille ja neljäs puskurin imemiseen synaptosominäytteiden läpi; ohjauspaneelistä, jonka kolmitiehanoilta hallitaan puskuriliuosten kulkeutumista; sekä

fraktiokeräimestä (Gilson FC204; Gilson), jonka avulla näytteiden läpi kulkeutunut puskuriliuos voidaan kerätä aikafraktioiden talteen 96-kuoppalevyille (joustava polyetyleenitereftalaatti, 200 µl/kuoppa; PerkinElmer, Waltham MA, Yhdysvallat).

Kolmesta ensimmäisestä pumpusta yksi on tarkoitettu perfuusiopuskurille, yksi tutkittavia yhdisteitä sisältävälle puskuriliuokselle (stimulaatiopuskuri) ja yksi mahdollisen esikäsitteilyn sisältävälle puskuriliuokselle (esikäsitteilypuskuri). Kunkin pumpun kautta kulkee yhteensä kahdeksan eri letkulinjaa vastaten kahdeksaa suodatinpidikettä. Tämä mahdollistaa kahdeksan rinnakkaisen määrityksen suorittamisen esimerkiksi eri pitoisuuksilla tutkittavaa yhdistettä. Eri liuosten johtamista suodatinpidikkeille hallitaan ohjauspaneelilla, joka koostuu pleksimuoviin kiinnitetyistä kolmitiehanoista. Ohjauspaneelia käyttäen on mahdollista reaaliaikaisesti valita kullekin suodatinpidikkeelle kulkeutuva liuos kolmesta edellä mainitusta vaihtoehdosta. Valittu liuos tippuu suodatinpidikkeille tasaisella nopeudella injektioruiskuista valmistettujen nestejohtimien läpi. Kaksi muuta puskuriliuosta kulkeutuvat vastavuoroisesti muualle kuin suodatinpidikkeille. Perfuusiopuskurin tapauksessa tämä tarkoittaa pääsääntöisesti jäteastiaa, mutta materiaalien kulutuksen vähentämiseksi stimulaatiopuskuri ja esikäsitteilypuskuri kierrätetään takaisin alkupisteeseensä. Neljäs pumppu imee jatkuvasti puskuriliuosta suodatinpidikkeiltä, jolloin aikaansaadaan jatkuvat perfuusiolosuhteet. Suodatinpidikkeiltä imetty liuos voidaan johtaa jäteastiaan tai kerätä talteen fraktiokeräimellä. Tyypillisessä synaptosomiperfuusiokokeessa suodatinpidikkeillä olevia synaptosomeja perfusoidaan ensin perfuusiopuskurilla, sen jälkeen esikäsitteilypuskurilla ja lopuksi lyhyen aikaa stimulaatiopuskurilla. Tämän jälkeen synaptosomeja perfusoidaan jälleen perfuusiopuskurilla, joka kerätään talteen fraktiokeräimellä. Mittaamalla kuoppalevyille kerätyn perfuusiopuskurin radioaktiivisuus voidaan todeta, ovatko stimulaatiopuskurin sisältämät tutkittavat yhdisteet aiheuttaneet spontaanin vapautumisen ylittävää välittäjäaineen vapautumista.



**Kuva 8. Kaavakuva synaptosomiperfuusiolaitteiston toimintaperiaatteesta.** Radioleimattua dopamiinia sisältävät synaptosominäytteet pipetoidaan suodatinpidikkeillä oleville suodatinpapereille. Perfuusiopuskuri (PP), esikäsitteilypuskuri (EP) ja stimulaatiopuskuri (SP) kuljetetaan kolmen pumpun (P) avulla joko suodatinpidikkeille tai takaisin puskuriastiaan (perfuusiopuskurin tapauksessa vaihtoehtoisesti jäteastiaan). Kukin kolmesta linjastosta koostuu kahdeksasta rinnakkaisesta letkulinjasta. Ohjauspaneelin kolmitiehanoja käyttäen valitaan kullekin suodatinpidikkeelle johdettava puskuri, joka tippuu tasaisella nopeudella näytteiden päälle. Samanaikaisesti neljännen pumpun avulla puskuri imetään näytteiden läpi ja kuljetetaan fraktiokeräimelle, missä se on mahdollista joko kerätä talteen kuoppalevyille radioaktiivisuuden mittaamista varten tai johtaa jäteastiaan.

#### 4.3.2. Synaptosomien valmistus hiiren striatumista

Vapautumiskokeita varten valmistettiin hiiren striatumista P1-synaptosomipelletit. Hiiri lopetettiin niskamurrolla ja aivot dissekoitiin ulos kallosta. Aivot asetettiin jääkylmälle kostutetulle käsipaperille ja kumpikin striatum dissekoitiin. Dissekoitaessa näytteet otettiin pääosin dorsaalista striatumista kuitenkin määrittelemättä tarkemmin dorsaalisen ja ventraalisen striatumien eroa. Striatum-näytteet upotettiin 500 µl:aan jääkylmää homogenisaatioliuosta (0,32 M sukroosi, 5 mM HEPES pH 7,5) ja homogenisoitiin käsin 2 ml lasi-teflon-homogenisaattorilla (15 vetoa). Homogenaatti siirrettiin 2 millilitran näyteputkeen, johon lisättiin myös homogenisaattorin huuhtelu-liuos (2 x 500 µl homogenisaatioliuosta). Koko liuosmäärä jaettiin kahteen näyteputkeen ja sentrifugoitiin (12000 g, 4 °C, 20 min; Eppendorf Centrifuge 5810R;

Eppendorf, Hampuri, Saksa). Sentrifugoinnin jälkeen näytteitä säilytettiin jäissä, ja kunkin koe-eläimen näytettä käytettiin kahdessa peräkkäisessä perfuusiokokeessa. Käytetty valmistustapa on nopea ja yksinkertainen, mutta lopputuloksena ei ole erityisen puhdas näyte. Lisäämällä esimerkiksi useampia sentrifugointivaiheita on mahdollista valmistaa myös pidemmälle puhdistettuja synaptosominäytteitä. Käytännön tutkimuskokemus on kuitenkin osoittanut, että [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista tutkivissa kokeissa jo P1-preparaatti on riittävä, ja esimerkiksi yhdellä lisäseentrifugoinnilla valmistettavaa P2-preparaattia käyttämällä saatavat tulokset ovat identtisiä P1-preparaattia käyttämällä saatujen tulosten kanssa (Salminen ym. 2004).

#### 4.3.3. Radioleimatun dopamiinin sisäänotto synaptosomeihin

Sentrifugoinnin tuloksena saatu P1-pelletti (2 kpl / koe-eläin) resuspendoitiin 800 µl:an sisäänottopuskuria (128 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 3,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES pH 7,5, 10 mM glukoosi, 1 mM askorbiinihappo, 10 µM pargyliini). Suspensiota inkuboitiin 10 minuuttia 37 °C vesihauteessa, minkä jälkeen lisättiin 4 µl [<sup>3</sup>H]dopamiinia (spesifinen aktiivisuus 45–46 Ci/mmol, pitoisuus 1 µCi/µl; lopullinen [<sup>3</sup>H]dopamiinipitoisuus n. 110 nM) ja inkuboitiin edelleen 5 minuuttia 37 °C vesihauteessa.

#### 4.3.4. Radioleimatun dopamiinin vapautumiskokeet

Vapautumiskokeet suoritettiin huoneenlämmössä. Radioleimattua dopamiinia sisältävät synaptosomit pipetoitiin suodatinpidikkeillä oleville suodatinpapereille (kahdeksan suodatinta, 80 µl / suodatin). Synaptosomien perfusointi perfuusiopuskurilla (sisäänottopuskuri, jossa lisäksi 1 µM nomifensiinia, 1 µM atropiinia ja 0,1 % naudan seerumin albumiinia) aloitettiin välittömästi kunkin pipetoinnin jälkeen. Perfuusionopeus oli noin 0,8 ml/min ja perfuusiota jatkettiin 10 minuuttia. Esikäsitteily α-konotoksiini MII:lla suoritettiin vaihtamalla halutuille suodatinpidikkeille kulkeutuva liuos pelkästä perfuusiopuskurista 50 nM α-konotoksiini MII:a sisältävään perfuusiopuskuriin viimeisen kolmen minuutin ajaksi. Kymmenen minuutin perfuusion jälkeen kutakin kahdeksasta suodatinpaperilla olevasta synaptosominäytteestä stimuloitiin 20 sekunnin

ajan perfuusiopuskurilla, johon oli lisätty valitut pitoisuudet tutkittavia yhdisteitä. Kukin kahdeksasta rinnakkaisesta näytteestä käsiteltiin omalla stimulaatiopuskurillaan, ja eri stimulaatiopuskurien ja letkulinjojen keskinäinen järjestys oli satunnaistettu. Stimuloinnin jälkeen synaptosomeista vapautunut [<sup>3</sup>H]dopamiini kerättiin fraktio-keräimellä kahdelle 96-kuoppalevyille noin 10 sekunnin aikafraktioina. Aikafraktioita kerättiin kustakin kokeesta 22 kappaletta. Kuoppalevyjen kuhunkin kuoppaan lisättiin 150 µl tuikenestettä (OptiPhase Supermix; PerkinElmer, Waltham MA, Yhdysvallat), levyt peitettiin tarrakalvolla ja liuokset sekoitettiin kääntelemällä levyjä ylösalaisin muutamaan otteeseen. Tämän jälkeen kunkin kuopan sisältämän liuoksen radioaktiivisuus määritettiin nestetuikelaskijalla (1450 MicroBeta TriLux; Wallac, Turku, Suomi).

Edellä kuvatulla menetelmällä mitattiin [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen nikotiinilla (0,01–30 µM) tai morfiinilla (1–3000 µM) käsitellyistä synaptosomeista. Nikotiinin ja morfiinin vaikutuksia tutkittiin erillisissä kokeissa. Lisäksi tutkittiin erillisissä kokeissa antagonistien vaikutusta stimuloituun [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumiseen. Stimulaatiopuskuriin lisättiin agonistin mukaan vaihteleva määrä dihydro-β-erytroidiinia (0,01–30 µM nikotiinin kanssa tai 0,001 µM–30 µM morfiinin kanssa), metyyliyllykoniiniä (0,3–300 µM tai 0,01–10 µM) tai naloksonia (3–3000 µM tai 10–3000 µM), ja perfuusiokoe suoritettiin kuten yllä. α-konotoksiini MII:n (0,1–1000 nM tai 0,1–300 nM) vaikutusta tutkittiin suorittamalla esikäsitely ennen nikotiini- tai morfiini-stimulaatiota usealla rinnakkaisella antagonistipitoisuudella. Antagonisteja tutkineissa kokeissa kontrolleina käytettiin kahta rinnakkaista määritystä pelkkää agonistia sisältävän stimulaatiopuskurin aiheuttamasta vapautumisesta. Stimuloitu [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen pyrittiin myös jaottelemaan α-konotoksiini MII:lle herkkään ja resistenttiin komponenttiin. Tästä syystä kaikissa muita yhdisteitä käyttäneissä kokeissa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen määritettiin saman koe-eläimen aivokudoksesta valmistetuista synaptosomeista sekä ilman 50 nM α-konotoksiini MII -esikäsitelyä että esikäsitelyn jälkeen. Määritykset tehtiin kahdessa peräkkäisessä perfuusiokokeessa siten, että kummassakin kokeessa esikäsitely suoritettiin neljälle kahdeksasta rinnakkaisesta näytteestä.

#### 4.3.5. Tulosten käsittely

Nestetuikelaskimen tuottama tulosaineisto eli kustakin kuopasta mitattujen signaalien määrä käsiteltiin Coloradon yliopistossa laaditun ohjelmakoodin avulla R-ohjelmointiympäristössä (versio 2.15.2.; R Core Team). Kullakin pitoisuustasolla suoritettua stimulaation jälkeen mitatut signaalimäärät aikafraktioittain esitettiin kuvaajan muodossa, ja stimuloinnin aiheuttama huippu tunnistettiin silmämääräisesti. Ennen huippua ja huipun jälkeen kerättyjä fraktioita käytettiin vapautumisen perustason laskemiseen eksponentiaalisella hajoamisyhtälöllä. Laskettu perustaso vähennettiin kustakin fraktiosta, ja perustason 15 %:lla tai enemmän ylittävät fraktiot laskettiin yhteen. Näin saatiin kullekin pitoisuustasolle laskettua huipun sisältävien fraktioiden summattu vapautuminen vapautumisyksikköinä. Vapautumisen  $\alpha$ -konotoksiini MII:lle herkkä osuus laskettiin vähentämällä kunkin pitoisuustason ilman esikäsitteilyä aiheuttamasta vapautumisesta (totaalivapautuminen) esikäsitteilyn jälkeen mitattu vapautuminen ( $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentti vapautuminen). Annosvastetulokset siirrettiin GraphPad Prism -ohjelmaan (versio 6.02; GraphPad Software, La Jolla CA, Yhdysvallat), jolla suoritettiin tulosten ei-lineaarinen regressioanalyysi.

Ei-lineaarisen regressioanalyysin avulla kunkin koe-eläimen tulosaineisto sijoitettiin yhtälöön (1), jossa Y kuvastaa mitattua vapautumista, X kuvastaa yhdisteen logaritmita pitoisuutta,  $R_{\min}$  kuvastaa vapautumisen vähimmäismäärää,  $R_{\max}$  kuvastaa vapautumisen enimmäismäärää,  $EC_{50}$  (antagonistien tapauksessa  $IC_{50}$ ) kuvastaa pitoisuutta, joka saa aikaan puolet enimmäisvasteesta, ja  $H_i$  kuvastaa Hill-termiä (Hill slope).

$$(1) \quad Y = R_{\min} + \frac{(R_{\max} - R_{\min})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) * H_i}}$$

Antagonistikokeiden tapauksessa kontrollin eli pelkän agonistin aiheuttama vapautuminen sijoitettiin yhtälöön merkiten antagonistipitoisuudeksi tuhannesosa matalimmasta koepitoisuudesta, millä approksimoitiin nollapitoisuutta. Yksittäiset poikkeukselliset tulosarvot poistettiin aineistosta regressioanalyysin yhteydessä käyttäen ROUT-menetelmää (robust regression and outlier removal; Motulsky ja Brown 2006). Kaikkien koe-eläinten tulosten yhteisaineiston perusteella testattiin F-testillä (extra sum of squares F test), sijoittuvatko kunkin koasetelman tulokset paremmin yhtälöön, jossa Hill-tekijä on vakio (agonisteilla  $H_i = 1$ , antagonisteilla  $H_i = -1$ ).

Morfiinin tapauksessa sekä totaalivapautumista että  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistenttiä ja -herkkää vapautumista koskevat tulokset sijoittuivat paremmin yhtälöön, jossa Hill-tekijä ei ole vakio ( $p < 0,05$  kaikissa koetilanteissa). Muissa tapauksissa tulokset sijoittuivat paremmin yhtälöön, jossa Hill-tekijä on vakio ( $p > 0,05$ ), ja tekijä määritettiin vakioksi myös yksittäisten koe-eläinten tulosten regressioanalyyseissä. Samalla tavalla tutkittiin myös, sopivatko kokeiden tulokset paremmin yhtälöön, jossa  $R_{\min} = 0$  vai yhtälöön, jossa  $R_{\min}$  ei ole vakio. Lähes kaikissa tapauksissa todettiin tulosten sopivan paremmin yhtälöön, jossa  $R_{\min} = 0$ . Poikkeuksena olivat  $\alpha$ -konotoksiini MII:n annosvastetulokset. Tällä perusteella, ja koska tuloksista oli aiemmassa vaiheessa vähennetty vapautumisen perustaso,  $R_{\min}$  määritettiin mainittua poikkeusta lukuunottamatta vakioksi myös yksittäisissä regressioanalyyseissä. Yhteisaineistolle suoritetuilla regressioanalyysillä laadittiin lisäksi tuloksia havainnollistavat kuvaajat.

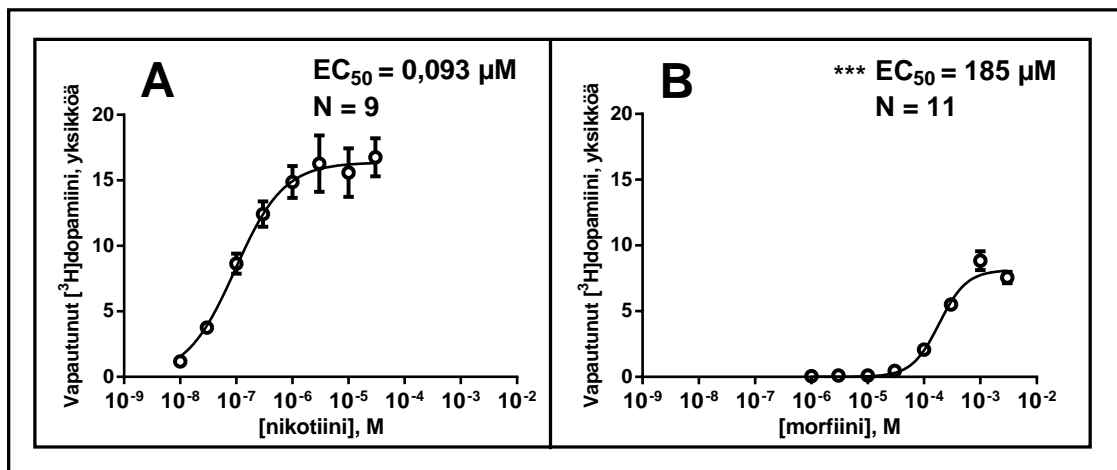
Tilastolliset analyysit suoritettiin IBM SPSS 21 -ohjelmalla (IBM, Armonk NY, Yhdysvallat). Agonistien ja antagonistien [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautumista muuttavan vaikutuksen tilastollista merkitsevyyttä tutkittiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä annosvasteaineiston perusteella. Muut tilastolliset tarkastelut tehtiin käyttäen kunkin koe-eläimen ei-lineaaristen regressioanalyysien tulosparametreja ( $\log\text{EC}_{50}$ ,  $\log\text{IC}_{50}$ ,  $R_{\max}$ ), joita verrattiin kaksisuuntaisilla Studentin t-testeillä. Logaritmisia arvoja käytettiin aineiston normaalijakautuneisuuden säilyttämiseksi, ja tulososiossa ilmoitetut  $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$ -arvot ja niiden luottamusvälit on laskettu logaritmisten arvojen ja niiden hajontalukujen perusteella. Parillisia t-testejä käytettiin verrattaessa saman koe-eläimen näytteistä määritetyn  $\alpha$ -konotoksiini MII:lle herkän ja resistentin vapautumisen parametrejä. Muissa tapauksissa käytettiin parittomia t-testejä.

## 5 TULOKSET

### 5.1. Nikotiinin ja morfiinin stimuloima [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautuminen

Hiiren striataalisten synaptosomien stimulointi sekä nikotiinilla (Kuva 9A) että morfiinilla (Kuva 9B) sai aikaan perustason ylittävän ja annosriippuvaisen

[<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen. Kummankin agonistin vaikutus oli tilastollisesti merkitsevä (nikotiini:  $F_{7,62} = 14,9$ ,  $p < 0,001$ ; morfiini:  $F_{7,69} = 107,7$ ,  $p < 0,001$ ). Nikotiinin ja morfiinin stimuloiman [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen keskimääräiset EC<sub>50</sub>-arvot (EC<sub>50</sub> = agonistipitoisuus, jonka aikaansaama vaste on 50 % maksimivasteesta) ja enimmäisvapautumiset sekä näiden hajontaluvut yksittäisten koehiirten regressioanalyysitulosten perusteella laskettuna on ilmoitettu Taulukossa 1A. [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista stimuloiva morfiinipitoisuus oli huomattavasti ja tilastollisesti merkitsevästi suurempi kuin vapautumisen stimulaatioon tarvittava nikotiinipitoisuus (morfiini:  $\log EC_{50} = -3,73 \pm 0,09$ ; nikotiini:  $\log EC_{50} = -7,03 \pm 0,11$ ;  $t(18) = 72,8$ ,  $p < 0,001$ ). Lisäksi suurin morfiinistimulaation vapauttama [<sup>3</sup>H]dopamiinimäärä oli tilastollisesti merkitsevästi pienempi kuin suurin nikotiinistimulaation vapauttama [<sup>3</sup>H]dopamiinimäärä (morfiini:  $R_{\max} = 8,0 \pm 1,5$ ; nikotiini:  $R_{\max} = 16,3 \pm 4,2$ ;  $t(9,6) = -5,6$ ,  $p < 0,001$ ).

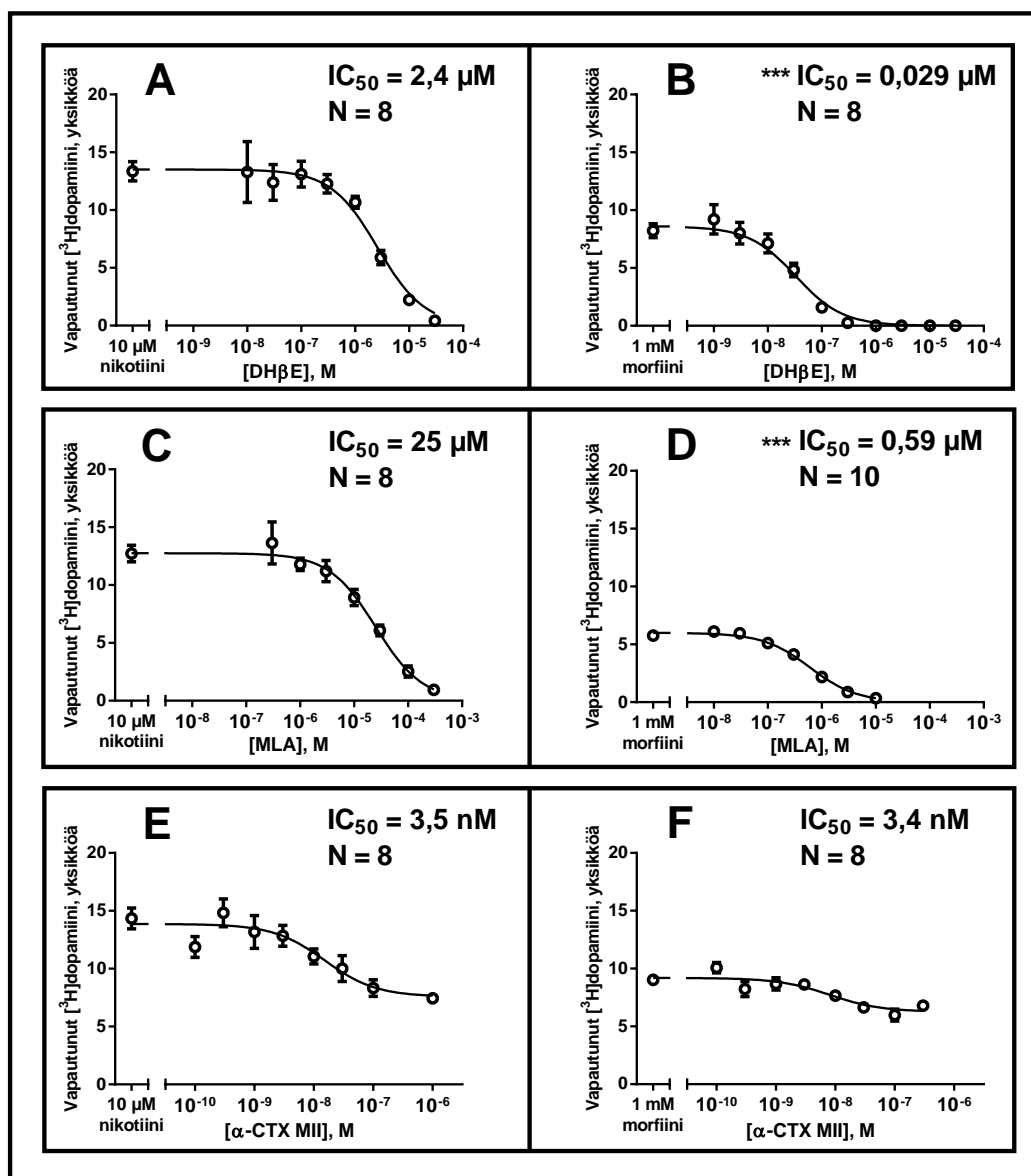


**Kuva 9. Nikotiinin ja morfiinin stimuloima [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen hiiren striataalisista synaptosomeista.** Synaptosomeja perfusoiitiin 10 minuuttia ja stimuloitiin sen jälkeen 20 sekuntia nikotiinilla (A) tai morfiinilla (B). Molemmat agonistit stimuloivat annosriippuvaisesti [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista. Vapautumiseen tarvittava pitoisuus oli huomattavasti korkeampi ja maksimaalinen vapautuminen pienempi morfiinin tapauksessa. Kuvaajat on laadittu sovittamalla N:n koehiiren synaptosomeista mitattu keskiarvoistettu [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen yhtälöön (1) epälinearisella regressioanalyysillä; virhepalkit kuvastavat keskiarvon keskivirhettä. EC<sub>50</sub> = Puolet maksimivasteesta aikaansaava pitoisuus (N:n koehiiren regressioanalyysi-parametrien keskiarvo); \*\*\* = tilastollisesti merkitsevä ero nikotiiniin parittomalla t-testillä,  $p < 0,001$

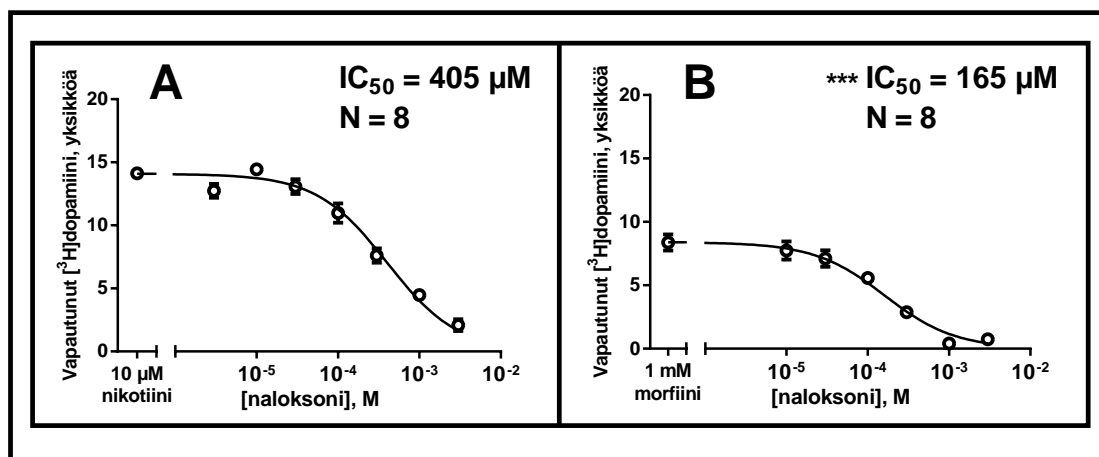


Nikotiiniantagonistit DH $\beta$ E, MLA ja  $\alpha$ -CTX MII sekä opioidiantagonisti naloksoni estivät nikotiinin (10  $\mu$ M) stimuloimaa [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista synaptosomeista (Kuvat 10 ja 11). Kaikkien antagonistien vaikutus oli tilastollisesti merkitsevää (DH $\beta$ E:  $F_{8,53} = 24,3$ ,  $p < 0,001$ ; MLA:  $F_{7,56} = 31,6$ ,  $p < 0,001$ ;  $\alpha$ -CTX MII:  $F_{8,99} = 4,54$ ,  $p < 0,001$ ; naloksoni:  $F_{7,52} = 81,3$ ,  $p < 0,001$ ). Kaikki antagonistit estivät myös morfiinin (1 mM) stimuloimaa [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista tilastollisesti merkitsevästi (DH $\beta$ E:  $F_{10,53} = 27,0$ ,  $p < 0,001$ ; MLA:  $F_{7,70} = 55,8$ ,  $p < 0,001$ ;  $\alpha$ -CTX MII:  $F_{8,142} = 7,89$ ,  $p < 0,001$ ; naloksoni:  $F_{6,57} = 36,2$ ,  $p < 0,001$ ). [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen inhibition keskimääräiset IC $_{50}$ -arvot (IC $_{50}$  = antagonistipitoisuus, jonka aikaansaama inhibitio on 50 % maksimi-inhibitiosta) ja vapautumisen määrät ilman antagonistia sekä näiden hajontaluvut yksittäisten koehiirten regressioanalyysitulosten perusteella laskettuna on ilmoitettu jokaiselle antagonistille Taulukossa 1B. Havaittu inhibitio oli annosriippuvainen ja muiden kuin  $\alpha$ -CTX MII:n (Kuva 10E–F) tapauksessa käytännössä täydellinen riittävän suurilla pitoisuuksilla.  $\alpha$ -CTX MII esti maksimaalisen inhibition aiheuttavilla pitoisuuksilla keskimäärin 50 % nikotiinin ja 31 % morfiinin aiheuttamasta vapautumisesta (Taulukko 1B).

[ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen estämiseen tarvittavat antagonistipitoisuudet olivat huomattavasti ja tilastollisesti merkitsevästi pienempiä estettäessä morfiinin stimuloimaa vapautumista nikotiinin stimuloimaan vapautumiseen verrattuna DH $\beta$ E:n (nikotiini:  $\log IC_{50} = -5,62 \pm 0,09$ ; morfiini:  $\log IC_{50} = -7,53 \pm 0,05$ ;  $t(14) = 53,2$ ,  $p < 0,001$ ) ja MLA:n (nikotiini:  $\log IC_{50} = -4,60 \pm 0,06$ ; morfiini:  $\log IC_{50} = -6,23 \pm 0,09$ ;  $t(16) = 44,1$ ,  $p < 0,001$ ) tapauksessa. Myös [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen estämiseen tarvittava naloksonipitoisuus oli tilastollisesti merkitsevästi pienempi morfiinin kuin nikotiinin tapauksessa, joskaan ero ei ollut yhtä huomattava (nikotiini:  $\log IC_{50} = -3,39 \pm 0,16$ ; morfiini:  $\log IC_{50} = -3,78 \pm 0,13$ ;  $t(14) = 5,5$ ,  $p < 0,001$ ).  $\alpha$ -CTX MII sen sijaan esti sekä nikotiinin että morfiinin stimuloimaa [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista yhtä suurilla pitoisuuksilla (nikotiini:  $\log IC_{50} = -8,46 \pm 0,91$ ; morfiini:  $\log IC_{50} = -8,47 \pm 0,74$ ;  $t(14) = 0,02$ ,  $p = 0,99$ ).



**Kuva 10. Nikotiinin ja morfiinin stimuloiman [ $^3H$ ]dopamiinin vapautumisen esto nikotiiniantagonisteilla.** Hiiren striataalisia synaptosomeja perfusoiittiin 10 minuuttia ja stimuloitiin sen jälkeen 20 sekuntia nikotiinilla (vasemmalla) tai morfiinilla (oikealla). Antagonistit (A, B = DH $\beta$ E; C, D = MLA; E, F =  $\alpha$ -CTX MII) lisättiin yhdessä agonistin kanssa (DH $\beta$ E, MLA) tai kolmen minuutin esikäsitteilynä ennen stimulaatiota ( $\alpha$ -CTX MII). Kaikki antagonistit estivät annosriippuvaisesti kummankin agonistin stimuloimaa [ $^3H$ ]dopamiinin vapautumista.  $\alpha$ -CTX MII esti vain osan agonistien vaikutuksesta. Morfiinin vaikutuksen estoon vaadittavat DH $\beta$ E- ja MLA-pitoisuudet olivat pienempiä kuin nikotiinin vaikutusta estämiseen vaadittavat pitoisuudet. Kuvaajat on laadittu sovittamalla N:n koehiiren synaptosomeista mitattu keskiarvoistettu [ $^3H$ ]dopamiinin vapautuminen yhtälöön (1) epälinearisella regressioanalyysillä; virhepalkit kuvastavat keskiarvon keskivirhettä.  $IC_{50}$  = Puolet agonistin vaikutuksesta estävä pitoisuus (N:n koehiiren regressioanalyysiparametrien keskiarvo); DH $\beta$ E = dihydro- $\beta$ -erytroidiini; MLA = metyyliylkakoniitiini;  $\alpha$ -CTX MII =  $\alpha$ -konotoksiini MII; \*\*\* = tilastollisesti merkitsevä ero nikotiiniin parittomalla t-testillä,  $p < 0,001$



**Kuva 11. Nikotiinin ja morfiinin stimuloiman  $[^3\text{H}]$ dopamiinin vapautumisen esto opioidiantagonisti naloksonilla.** Hiiren striataalisia synaptosomeja perfusoiitiin 10 minuuttia ja stimuloitiin sen jälkeen 20 sekuntia nikotiinilla (vasemmalla) tai morfiinilla (oikealla). Naloksoni lisättiin yhdessä agonistin kanssa. Naloksoni esti annosriippuvaisesti kummankin agonistin stimuloimaa  $[^3\text{H}]$ dopamiinin vapautumista. Morfiinin vaikutuksen estoon vaadittava pitoisuus oli pienempi kuin nikotiinin vaikutuksen estoon vaadittava pitoisuus. Kuvaajat on laadittu sovittamalla N:n koehiiren synaptosomeista mitattu keskiarvoistettu  $[^3\text{H}]$ dopamiinin vapautuminen yhtälöön (1) epälineaaraisella regressioanalyysillä; virhepalkit kuvastavat keskiarvon keskivirhettä.  $\text{IC}_{50}$  = Epälineaaraisella regressioanalyysillä estimoitu puolet agonistin vaikutuksesta estävä pitoisuus (N:n koehiiren regressioanalyysiparametrien keskiarvo); \*\*\* = tilastollisesti merkitsevä ero nikotiiniin parittomalla t-testillä,  $p < 0,001$

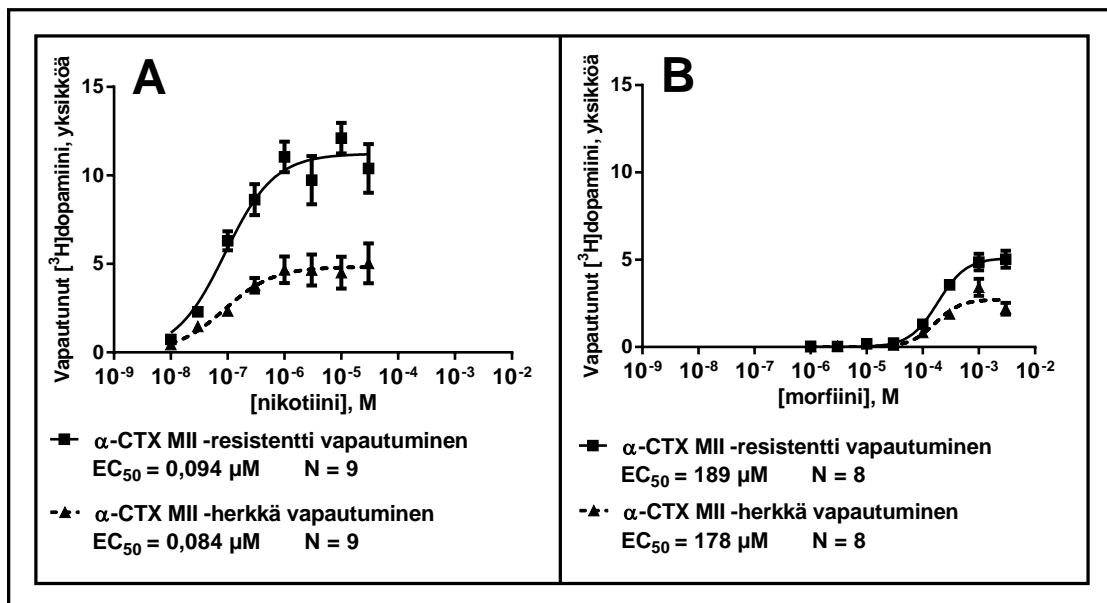
## 5.2. $[^3\text{H}]$ dopamiinin vapautumisen jaottelu kahteen komponenttiin

Agonistien stimuloima  $[^3\text{H}]$ dopamiinin vapautuminen synaptosomeista jaoteltiin  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistenttiin ja  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkkään komponenttiin kolmen minuutin esikäsittelyn (50 nM) avulla. Nikotiinin ja morfiinin stimuloiman  $[^3\text{H}]$ dopamiinin vapautumisen komponenttien annosvastekuvaajat on esitetty Kuvassa 12. Eri komponenttien keskimääräiset  $\text{EC}_{50}$ -arvot ja maksimaaliset vapautumiset sekä näiden hajontaluvut yksittäisten koehiirten regressioanalyysitulosten perusteella laskettuna on ilmoitettu Taulukossa 2A.  $\alpha$ -CTX MII -esikäsittelyn estämä osuus  $[^3\text{H}]$ dopamiinin vapautumisesta kaikkien koasetelmien keskiarvona laskettuna oli 30 % sekä nikotiinin että morfiinin stimuloimasta vapautumisesta (Taulukko 2).

Kummankaan agonistin tapauksessa  $\alpha$ -CTX MII-resistentin ja  $\alpha$ -CTX MII -herkän [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen välillä ei ollut eroa siinä, kuinka suuri pitoisuus agonistia tarvittiin aiheuttamaan vapautuminen (nikotiini:  $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen  $\log EC_{50} = -7,03 \pm 0,06$ ;  $\alpha$ -CTX MII -herkän vapautumisen  $\log EC_{50} = -7,07 \pm 0,29$ ;  $t(8) = 0,52$ ,  $p = 0,62$ ; morfiini:  $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen  $\log EC_{50} = -3,72 \pm 0,09$ ;  $\alpha$ -CTX MII -herkän vapautumisen  $\log EC_{50} = -3,75 \pm 0,24$ ;  $t(7) = 0,24$ ,  $p = 0,82$ ).

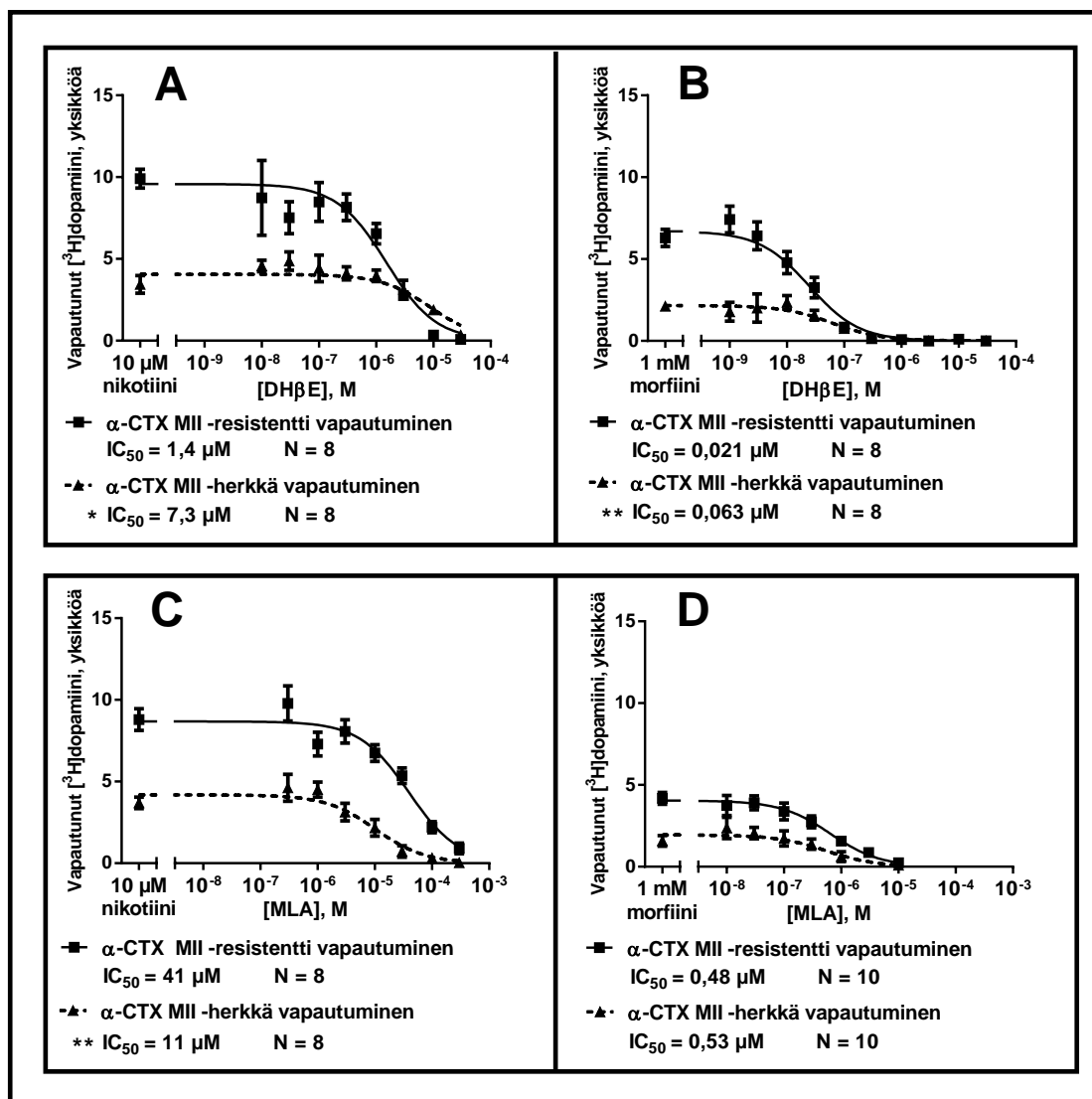
**Taulukko 1. Agonistien stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen ja vapautumisen inhibition parametrit.** Parametrit on laskettu epälineaarisilla regressioanalyysillä sovittamalla kunkin yksittäisen koehiiren tulokset yhtälöön (1). **(A)** Nikotiinin ja morfiinin stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen  $EC_{50}$ -arvot, maksimivapautuminen ( $R_{max}$ ) ja koehiirten kokonaismäärä (N). **(B)** [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen antagonistin inhibition  $IC_{50}$ -arvot, maksimivapautuminen (vapautuminen ilman antagonistia;  $R_{max}$ ) ja koehiirten kokonaismäärä (N).  $\alpha$ -konotoksiini MII:lle ilmoitettu myös minimi-vapautuminen ( $R_{min}$ ). DH $\beta$ E = dihydro- $\beta$ -erytroidiini; MLA = metyyli-lykakoniini;  $\alpha$ -CTX MII =  $\alpha$ -konotoksiini MII; \*\*\* = tilastollisesti merkitsevä ero nikotiiniin parittomalla t-testillä,  $p < 0,001$

<b>A</b>	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$\log EC_{50}$ $\pm$ keskihajonta	$EC_{50}$ 95 % luottamusväli ( $\mu$ M)	$R_{max}$ (yksikköä) $\pm$ keskihajonta	N	
Nikotiini	0,093	-7,03 $\pm$ 0,11	0,077–0,113	16,3 $\pm$ 4,2	9	
Morfiini	185	-3,73 $\pm$ 0,09 ***	161–212	8,0 $\pm$ 1,5	11	
<b>B</b>	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	$\log IC_{50}$ $\pm$ keskihajonta	$IC_{50}$ 95 % luottamusväli ( $\mu$ M)	$R_{max}$ (yksikköä) $\pm$ keskihajonta	$R_{min}$ (yksikköä) $\pm$ keskihajonta	N
<b>Nikotiini</b>						
+ DH $\beta$ E	2,39	-5,62 $\pm$ 0,09	2,02–2,82	13,6 $\pm$ 2,7	-	8
+ MLA	25,2	-4,60 $\pm$ 0,06	22,3–28,4	12,8 $\pm$ 2,4	-	8
+ $\alpha$ -CTX MII	0,0035	-8,46 $\pm$ 0,91	0,0006–0,0200	14,3 $\pm$ 3,9	7,2 $\pm$ 3,5	8
+ Naloksoni	405	-3,39 $\pm$ 0,16	299–549	14,1 $\pm$ 0,8	-	8
<b>Morfiini</b>						
+ DH $\beta$ E	0,029	-7,53 $\pm$ 0,05 ***	0,026–0,033	8,2 $\pm$ 2,4	-	8
+ MLA	0,585	-6,23 $\pm$ 0,09 ***	0,506–0,677	6,1 $\pm$ 1,0	-	10
+ $\alpha$ -CTX MII	0,0034	-8,47 $\pm$ 0,74	0,0008–0,0141	9,0 $\pm$ 1,3	6,2 $\pm$ 0,8	8
+ Naloksoni	165	-3,78 $\pm$ 0,13 ***	130–210	8,4 $\pm$ 2,4	-	8

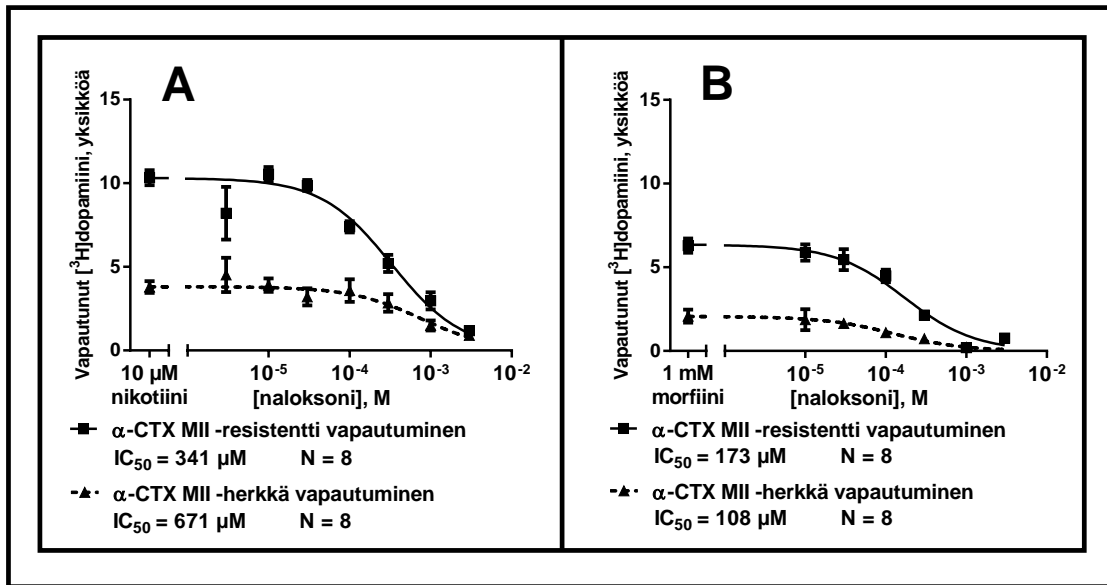


**Kuva 12. Nikotiinin ja morfiinin stimuloima  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentti ja  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkkä [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen.** Synaptosomeja perfusoiittiin 10 minuuttia, josta viimeiset kolme minuuttia 50 nM  $\alpha$ -konotoksiini MII:a ( $\alpha$ -CTX MII) sisältävällä puskurilla. Sen jälkeen synaptosomeja stimuloitiin 20 sekuntia nikotiinilla (A) tai morfiinilla (B).  $\alpha$ -CTX MII -herkkä vapautuminen laskettiin vähentämällä esikäsittelyn jälkeen mitattu [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen ilman esikäsittelyä mitatusta [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisesta. [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen kahden komponentin välillä ei ollut eroa herkkyydessä kummallekaan agonisteille. Kuvaajat on laadittu sovittamalla N:n koehiiren synaptosomeista mitattu keskiarvoistettu [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen yhtälöön (1) epälinearisella regressioanalyysillä; virhepalkit kuvastavat keskiarvon keskivirhettä. EC<sub>50</sub> = Puolet maksimivasteesta aikaansaava pitoisuus (N:n koehiiren regressioanalyysiparametrien keskiarvo)

Nikotiiniantagonistit DH $\beta$ E ja MLA sekä opioidiantagonisti naloksoni estivät yhdessä nikotiinin (10  $\mu$ M) tai morfiinin (1 mM) kanssa annosteltuna kummankin agonistin stimuloiman [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen kumpaakin komponenttia (Kuvat 13 ja 14). Kummankin komponentin inhibition keskimääräiset IC<sub>50</sub>-arvot ja vapautumisen määrät ilman antagonistia sekä näiden hajontaluvut yksittäisten koehiirten regressioanalyysitulosten perusteella laskettuna on ilmoitettu jokaiselle antagonistille Taulukossa 2B. Havaittu inhibitio oli kaikissa koeasetelmissä annosriippuvainen ja riittävän suurilla antagonistipitoisuuksilla käytännössä täydellinen.



**Kuva 13. Nikotiinin ja morfiinin stimuloiman  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentin ja  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkän [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen esto nikotiini-antagonisteilla.** Synaptosomeja perfusoiittiin 10 minuuttia, josta viimeiset kolme minuuttia 50 nM  $\alpha$ -konotoksiini MII:a ( $\alpha$ -CTX MII) sisältävällä puskurilla. Sen jälkeen synaptosomeja stimuloitiin 20 sekuntia nikotiinilla (vasemmalla) tai morfiinilla (oikealla). Antagonistit (A, B = DH $\beta$ E; C, D = MLA) annosteltiin yhdessä agonistin kanssa.  $\alpha$ -CTX MII -herkkä vapautuminen laskettiin vähentämällä esikäsittelyn jälkeen mitattu [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen ilman esikäsittelyä mitatusta [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisesta. [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen kahden komponentin välillä oli havaittavissa eroja herkkyudessa antagonistille kummankin agonistin tapauksessa. Kuvaajat on laadittu sovittamalla N:n koehiiren synaptosomeista mitattu keskiarvoistettu [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen yhtälöön (1) epälinearisella regressioanalyysillä; virhepalkit kuvastavat keskiarvon keskivirhettä. IC<sub>50</sub> = Puolet agonistin vaikutuksesta estävä pitoisuus (N:n koehiiren regressioanalyysiparametrien keskiarvo); DH $\beta$ E = dihydro- $\beta$ -erytroidiini; MLA = metyylilykakoniittiini; \* = tilastollisesti merkitsevä ero komponenttien välillä parillisella t-testillä, p < 0,05; \*\* = p < 0,01



**Kuva 14. Nikotiinin ja morfiinin stimuloiman  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentin ja  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkän [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen esto naloksonilla.** Synaptosomeja perfusoiittiin 10 minuuttia, josta viimeiset kolme minuuttia 50 nM  $\alpha$ -konotoksiini MII:a ( $\alpha$ -CTX MII) sisältävällä puskurilla. Sen jälkeen synaptosomeja stimuloitiin 20 sekuntia nikotiinilla (A) tai morfiinilla (B). Naloksoni annosteltiin yhdessä agonistin kanssa.  $\alpha$ -CTX MII -herkkä vapautuminen laskettiin vähentämällä esikäsitteilyn jälkeen mitattu [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen ilman esikäsitteilyä mitatusta [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisesta. Kummankaan agonistin tapauksessa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen kahden komponentin välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa herkkyudessa naloksonille. Kuvaajat on laadittu sovittamalla N:n koehiiren synaptosomeista mitattu keskiarvoistettu [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen yhtälöön (1) epälinearisella regressioanalyysillä; virhepalkit kuvastavat keskiarvon keskivirhettä. IC<sub>50</sub> = Puolet agonistin vaikutuksesta estävä pitoisuus (N:n koehiiren regressioanalyysi-parametrien keskiarvo).

Nikotiinin stimuloiman [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen  $\alpha$ -CTX MII -resistentin ja  $\alpha$ -CTX MII -herkän komponentin herkkyudet tutkituille nikotiiniantagonisteille erosivat toisistaan tilastollisesti merkitsevästi (DH $\beta$ E:  $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen logIC<sub>50</sub> = -5,85 ± 0,22;  $\alpha$ -CTX MII -herkän vapautumisen logIC<sub>50</sub> = -5,14 ± 0,38; t(7) = -3,46, p < 0,05; MLA:  $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen logIC<sub>50</sub> = -4,39 ± 0,13;  $\alpha$ -CTX MII -herkän vapautumisen logIC<sub>50</sub> = -4,97 ± 0,27; t(7) = 4,50, p < 0,01). Nikotiinin stimuloiman vapautumisen eri komponenttien herkkyudet naloksonille puolestaan eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi ( $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen logIC<sub>50</sub> = -3,47 ± 0,11;  $\alpha$ -CTX MII -herkän vapautumisen logIC<sub>50</sub> = -3,17 ± 0,49; t(7) = -1,65, p = 0,14).

**Taulukko 2. Agonistien stimuloiman  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentin ja  $\alpha$ -konotoksiini MII -herkän [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen ja vapautumisen inhibition parametrit.** Parametrit on laskettu epälineaarisilla regressioanalyysillä sovittamalla kunkin yksittäisen koehiiren tulokset yhtälöön (1). **(A)** Nikotiinin ja morfiinin stimuloiman  $\alpha$ -CTX MII -resistentin ja herkän [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen  $EC_{50}$ -arvot, maksimivapautuminen ( $R_{max}$ ) ja koehiirten kokonaismäärä (N). **(B)** [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen  $\alpha$ -CTX MII -resistenttien ja -herkkien komponenttien antagonistin-inhibition  $IC_{50}$ -arvot, maksimivapautuminen (vapautuminen ilman antagonistia;  $R_{max}$ ) ja koehiirten määrä (N).  $\alpha$ -CTX MII =  $\alpha$ -konotoksiini MII; DH $\beta$ E = dihydro- $\beta$ -erytroidiini; MLA = metyyliylakoniitiini; \* = tilastollisesti merkitsevä ero komponenttien välillä parillisella t-testillä,  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

<b>A</b>	Vapautumisen komponentti	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$\log EC_{50}$ $\pm$ keskihajonta	$EC_{50}$ 95 % luottamusväli ( $\mu$ M)	$R_{max}$ (yksikköä) $\pm$ keskihajonta	N
<b>Nikotiini</b>	$\alpha$ -CTX MII -resistentti	0,094	-7,03 $\pm$ 0,06	0,084–0,105	11,4 $\pm$ 2,9	9
	$\alpha$ -CTX MII -herkkä	0,084	-7,07 $\pm$ 0,29	0,051–0,140	4,9 $\pm$ 1,8	9
<b>Morfiini</b>	$\alpha$ -CTX MII -resistentti	189	-3,72 $\pm$ 0,09	158–226	5,2 $\pm$ 1,3	8
	$\alpha$ -CTX MII -herkkä	178	-3,75 $\pm$ 0,24	112–284	2,8 $\pm$ 0,7	8
<b>B</b>	Vapautumisen komponentti	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	$\log IC_{50}$ $\pm$ keskihajonta	$IC_{50}$ 95 % luottamusväli ( $\mu$ M)	$R_{max}$ (yksikköä) $\pm$ keskihajonta	N
<b>Nikotiini</b>	$\alpha$ -CTX MII -resistentti	1,42	-5,85 $\pm$ 0,22	0,93–2,16	9,8 $\pm$ 2,5	8
	$\alpha$ -CTX MII -herkkä	7,28	-5,14 $\pm$ 0,38 *	3,51–15,09	4,1 $\pm$ 0,6	8
<b>+ MLA</b>	$\alpha$ -CTX MII -resistentti	40,7	-4,39 $\pm$ 0,13	31,6–52,3	8,7 $\pm$ 2,2	8
	$\alpha$ -CTX MII -herkkä	10,8	-4,97 $\pm$ 0,27 **	6,4–18,4	4,1 $\pm$ 0,7	8
<b>+ Naloksoni</b>	$\alpha$ -CTX MII -resistentti	341	-3,47 $\pm$ 0,11	275–424	10,3 $\pm$ 1,3	8
	$\alpha$ -CTX MII -herkkä	671	-3,17 $\pm$ 0,49	260–1731	3,9 $\pm$ 0,7	8
<b>Morfiini</b>	$\alpha$ -CTX MII -resistentti	0,021	-7,69 $\pm$ 0,18	0,015–0,029	6,3 $\pm$ 2,0	8
	$\alpha$ -CTX MII -herkkä	0,063	-7,20 $\pm$ 0,24 **	0,040–0,100	2,1 $\pm$ 0,5	8
<b>+ MLA</b>	$\alpha$ -CTX MII -resistentti	0,482	-6,32 $\pm$ 0,28	0,304–0,764	4,2 $\pm$ 1,5	10
	$\alpha$ -CTX MII -herkkä	0,525	-6,28 $\pm$ 0,46	0,248–1,114	2,0 $\pm$ 1,2	10
<b>+ Naloksoni</b>	$\alpha$ -CTX MII -resistentti	173	-3,76 $\pm$ 0,04	161–185	6,3 $\pm$ 1,6	8
	$\alpha$ -CTX MII -herkkä	108	-3,97 $\pm$ 0,57	36–322	2,2 $\pm$ 1,2	8

Morfiinin stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen  $\alpha$ -CTX MII -resistentin ja  $\alpha$ -CTX MII -herkän komponentin herkkyudet DH $\beta$ E:lle erosivat myös toisistaan tilastollisesti merkitsevästi ( $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen  $\log IC_{50} = -7,69 \pm 0,18$ ;  $\alpha$ -CTX MII -herkän vapautumisen  $\log IC_{50} = -7,20 \pm 0,24$ ;  $t(7) = -4,22$ ,  $p < 0,01$ ). Morfiinin stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen eri komponenttien herkkyudet MLA:lle ja naloksonille eivät sen sijaan eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi (MLA:  $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen  $\log IC_{50} = -6,32 \pm 0,28$ ;  $\alpha$ -CTX MII -herkän



vapautumisen  $\log IC_{50} = -6,28 \pm 0,46$ ;  $t(9) = -0,18$ ,  $p = 0,86$ ; naloksoni:  $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen  $\log IC_{50} = -3,76 \pm 0,04$ ;  $\alpha$ -CTX MII -herkän vapautumisen  $\log IC_{50} = -3,97 \pm 0,57$ ;  $t(7) = 1,07$ ,  $p = 0,32$ ).

## 6. POHDINTA

Tässä tutkimuksessa pyrittiin selvittämään, voiko morfiini stimuloida [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista hiiren striataalisista synaptosomeista presynaptisten nikotiinireseptorien välityksellä. Lisäksi koska kyseessä oli ensimmäinen Helsingin yliopiston synaptosomiperfuusiolaitteistolla suoritettu tutkimus, tutkimustavoitteena oli myös käytetyn menetelmän toiminnan varmistaminen tutkimalla jo aiemmin perusteellisesti karakterisoitua nikotiinin [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista stimuloivaa vaikutusta.

Sekä nikotiini että morfiini lisäsivät annosriippuvaisesti [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista hiiren perfusoiduista striataalisista synaptosomeista. Nikotiinin vaikutus oli tässä tutkimuksessa jonkin verran voimakkaampi ( $EC_{50} = 93$  nM) kuin esimerkiksi Grady ym. (1992) klassisessa tutkimuksessa ( $EC_{50} = 480$  nM) mutta kuitenkin osapuilleen samaa suuruusluokkaa. Morfiinin stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen enimmäismäärä oli pienempi kuin nikotiinin tapauksessa, ja vapautumiseen tarvittava morfiinipitoisuus oli hyvin suuri ( $EC_{50} = 185$   $\mu$ M). Morfiinin vapautumista stimuloivat vaikutukset vaativat pitoisuuksia, jotka olivat noin satatuhatta kertaa suurempia kuin morfiinin raportoitu affiniteetti aivohomogenaatissa tai solulinjassa ilmentyviin hiiren  $\mu$ -opioidireseptoreihin (Paul ym. 1989; Blake ym. 1997) ja yli satakertaisia myös verrattuna morfiinin affiniteettiin solulinjoissa ilmentyviin hiiren  $\delta$ - ja  $\kappa$ -reseptoreihin (Evans ym. 1992; Raynor ym. 1994). Näin ollen voidaan esittää morfiinin vaikutuksen todennäköisimmin välittyneen muutoin kuin presynaptisten opioidireseptorien kautta. Huomautettakoon lisäksi morfiinin stimuloineen [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista synaptosomeista osapuilleen saman suuruusluokan pitoisuuksilla kuin se stimuloi  $^{86}\text{Rb}^+$ -effluksia  $\alpha 4\beta 2$ -reseptoreita ilmentävissä soluissa ( $EC_{50} = 53,3$   $\mu$ M; Talka ym. 2013).

Kaikki tutkitut nikotiiniantagonistit estivät annosriippuvaisesti sekä nikotiinin (10  $\mu\text{M}$ ) että morfiinin (1 mM) stimuloimaa [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautumista synaptosomeista. Tämän tuloksen voi katsoa olevan kohtuullisen vahva todiste siitä, että paitsi nikotiinin myös morfiinin vaikutus välittyi nikotiinireseptorien kautta. Koska MLA inhiboi  $\alpha 7$ -reseptoreita selektiivisesti jo nanomolaarisilla pitoisuuksilla, mutta tässä tutkimuksessa sen nikotiinin vaikutusta inhiboiva vaikutus ilmaantui vasta suuremmilla pitoisuuksilla ( $\text{IC}_{50} = 25,2 \mu\text{M}$ ), voidaan tulosten katsoa tukevan aiempia havaintoja siitä, ettei dopamiinihermosolujen presynaptisilla  $\alpha 7$ -reseptoreilla ole merkittävää osuutta striataalisen dopamiinivapautumisen säätelyssä. MLA:n morfiinin vaikutusta inhiboivat pitoisuudet olivat pienempiä ( $\text{IC}_{50} = 585 \text{ nM}$ ) mutta edelleen korkeampia kuin  $\alpha 7$ -reseptoreita inhiboivat pitoisuudet (Davies ym. 1999), mikä viittaa morfiinin vaikutuksen välittyneen niin ikään heteromeeristen nikotiinireseptorien kautta. Samoin tätä tukevat havainnot DH $\beta$ E:n kyvystä estää kummankin agonistin vaikutusta. Lisäksi kummankin agonistin vaikutuksen osittainen herkkyys  $\alpha 3\beta 2^*/\alpha 6\beta 2^*$ -selektiiviselle antagonistille ( $\alpha$ -konotoksiini MII) toisaalta on linjassa aiempien nikotiinin vaikutusta koskevien havaintojen kanssa, ja toisaalta viittaa myös morfiinin vaikutuksen välittymiseen vähintään kahden eri reseptoripopulaation kautta. Hiiren striatumin dopamiinihermopäätteissä ei uskota esiintyvän  $\alpha 3^*$ -reseptoreita (Whiteaker ym. 2002), joten kyseiset reseptoripopulaatiot ovat todennäköisimmin  $\alpha 6\beta 2^*$  ja ei- $\alpha 6\beta 2^*$ . Hiirellä striataaliset dopamiinin vapautumista säätelevät presynaptiset ei- $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptorit ovat  $\alpha 4\beta 2^*$ -muotoa (Champtiaux ym. 2003; Salminen ym. 2004), joten myös tämän tutkimuksen havaitsemat morfiinin  $\alpha$ -konotoksiini MII -resistentit vaikutukset välittyivät mahdollisesti  $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptorien kautta. Tätä tukevat myös Talkan ym. (2013) tulokset, joissa morfiinin todettiin toimivan  $\alpha 4\beta 2$ -reseptorien osittaisagonistina.

Stimulaatiopuskurissa annosteltujen DH $\beta$ E:n ja MLA:n inhiboiva vaikutus oli huomattavasti voimakkaampi morfiinin stimuloimaa vapautumista määritettäessä. Tämän voi yhdessä suuren vaaditun morfiinipitoisuuden kanssa katsoa kuvastavan morfiinin huomattavasti nikotiinia ja nikotiiniantagonisteja heikompaan kykyä kilpailla nikotiinireseptoreihin sitoutumisesta. Esikäsittelynä annosteltu  $\alpha$ -CTX MII puolestaan esti yhtä voimakkaasti sekä nikotiinin että morfiinin stimuloimaa [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautumista. Koska nikotiinireseptorit palautuvat hitaasti  $\alpha$ -CTX MII:n aiheuttamasta

inhibitiosta (Salminen ym. 2004), antagonistin lisääminen myös stimulaatiopuskuriin ei ole tarpeellista. Näin ollen kokeissa agonistit ja  $\alpha$ -CTX MII eivät suoraan kilpailleet toistensa kanssa reseptoreihin sitoutumisesta, mikä voi selittää viimeksi mainitun tuloksen.

Nikotiinantagonistien lisäksi myös opioidiantagonisti naloksoni esti annosriippuvaisesti sekä nikotiinin että morfiinin stimuloimaa [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautumista synaptosomeista. Naloksonin kyvyn estää morfiinin vaikutusta voisi ensi silmäyksellä katsoa viittaavan opioidireseptorien osallistumiseen. Koska kuitenkin myös nikotiinin vaikutus oli estettävissä naloksonilla, voidaan todeta joko myös nikotiinin [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautumista stimuloivan vaikutuksen välittyvän jossain vaiheessa opioidireseptorien kautta tai naloksonin inhiboivan vaikutuksen välittyvän nikotiinireseptorien kautta. Jälkimmäistä vaihtoehtoa voidaan pitää todennäköisempänä, kun otetaan huomioon laaja tutkimuskirjallisuus presynaptisten nikotiinireseptorien välittämästä [ $^3\text{H}$ ]dopamiinin vapautumisesta striataalisista synaptosomeista (ks. 2.3.1.2.),. Agonistin vaikutuksen estämiseen tarvittavat naloksonipitoisuudet olivat hyvin suuria sekä nikotiinin ( $\text{IC}_{50} = 405 \mu\text{M}$ ) että morfiinin ( $\text{IC}_{50} = 165 \mu\text{M}$ ) tapauksessa. Tarvittavat naloksonipitoisuudet olivat yli satatuhatta kertaa suurempia kuin naloksonin sitoutumisaffiniteetti hiiren aivohomogenaatin  $\mu$ -reseptoreihin (Lewanowitsch ja Irvine 2003). Tutkimustulokset naloksonin affiniteetista aivohomogenaateissa tai solulinjoissa ilmentyviin hiiren  $\kappa$ - ja  $\delta$ -reseptoreihin vaihtelevat, mutta joka tapauksessa tässä tutkimuksessa naloksonin vaikuttavat pitoisuudet olivat vähintään 10000 kertaa suurempia kuin naloksonin affiniteetti hiiren  $\kappa$ -reseptoreihin ja noin 300 kertaa suurempia kuin heikoinkin raportoitu naloksonin affiniteetti hiiren  $\delta$ -reseptoreihin (Yasuda ym. 1993; Raynor ym. 1994; Lewanowitsch ja Irvine 2003). Myös tämä havainto tukee tulkintaa naloksonin vaikutusten välittymisestä muutoin kuin opioidireseptorien kautta. Toisaalta tarvittavat naloksonipitoisuudet olivat myös suurempia kuin naloksonipitoisuudet, joiden Talka ym. (2013) havaitsivat inhiboivan morfiinin stimuloimaa  $^{86}\text{Rb}^+$ -effluksia (0,3–3  $\mu\text{M}$ ), tai naloksonipitoisuudet, joiden on havaittu inhiboivan nikotiinin stimuloimaa katekoliamiinien vapautumista naudan kromaffinisoluista ( $\text{IC}_{50} = 29 \mu\text{M}$ ; Tome et al 2001). Sen sijaan naloksonin (ja morfiinin) rakenneanalogilla naltreksonilla on havaittu rotan hippokampuksen  $\alpha 4\beta 2$ -

reseptoreita inhiboiva vaikutus saman suuruusluokan pitoisuuksilla ( $IC_{50} = 141 \mu M$ ; Almeida ym. 2000). Nikotiiniantagonistien tapaan myös naloksoni esti voimakkaammin morfiinin kuin nikotiinin stimuloimaa [ $^3H$ ]dopamiinin vapautumista, mikä viittaa siihen, että naloksonin mahdollinen nikotiinireseptoreita salpaava vaikutus oli luonteeltaan kilpaileva.

Tässä tutkimuksessa kuvatut suuret opioidipitoisuudet viittaavat siihen, että synaptosomien opioidireseptorit olivat todennäköisesti saturoituneet jo ennen tutkimuksessa kuvattujen vasteiden syntymistä. Opioidireseptorien osuutta ei kuitenkaan voida täysin poissulkea. Suoraa dopamiinihermopäätteiden presynaptisten opioidireseptorien kautta välittyvää vaikutusta voidaan kylläkin pitää varsin epätodennäköisenä. Striatumin dopamiinihermopäätteissä ei uskota sijaitsevan  $\mu$ -reseptoreita (Trovero ym. 1990), eivätkä morfiinin  $\mu$ -reseptoriaffiniteetti verrattuna valtaisesti morfiinipitoisuudet anna syytä epäillä  $\mu$ -reseptoreilla olevan suoraa osuutta vaikutuksiin. Morfiinin affiniteetti  $\delta$ - ja  $\kappa$ -reseptoreihin on heikompi, ja osassa ventraalisen striatumien dopamiinihermopäätteitä on havaittu sijaitsevan  $\delta$ - ja  $\kappa$ -reseptoreita (Trovero ym. 1990; Svingos ym. 1999; Svingos ym. 2001a). Striataalisten  $\delta$ -reseptorien aktivaatio tehostaa dopamiinin vapautumista *in vivo* (Pentney ja Gratton 1991; Hirose ym. 2005; Hipólito ym. 2008), mutta aivoleikkeissä  $\delta$ -agonistit voivat joko inhiboida (Westfall ym. 1983; Schlösser ym. 1995; Britt ja McGehee 2008) tai stimuloida (Lubetzki ym. 1982) dopamiinin vapautumista. Synaptosomeissa  $\delta$ -agonistilla ei ollut vaikutusta (Ronken ym. 1993). Striataalisten  $\kappa$ -reseptorien aktivaatio puolestaan inhiboi dopamiinin vapautumista niin *in vivo*, aivoleikkeissä kuin synaptosomeissakin (Spanagel ym. 1992; Ronken ym. 1993; Schlösser ym. 1995; Britt ja McGehee 2008). Kaiken kaikkiaan  $\delta$ - ja  $\kappa$ -aktivaation paikallinen vaikutus striatumissa vaikuttaisi olevan pääasiassa dopamiinin vapautumista inhiboiva, joskin presynaptisten opioidireseptorien suhteellinen osuus vaikutuksista on tuntematon. Aiemmat tutkimustulokset opioidien vaikutuksista koskevat myös osin vain ventraalista striatumia, kun taas tässä tutkimuksessa synaptosominäytteet oli valmistettu pääosin dorsaalista striatumista. Tutkimustiedon valossa on siis mahdollista, että presynaptiset  $\delta$ -reseptorit voisivat stimuloida dopamiinin vapautumista osassa dorsaalisen striatumien dopaminergisia hermopäätteitä. Kun otetaan kuitenkin huomioon korkeat

morfiinipitoisuudet ja nikotiiniantagonistien kyky estää morfiinin stimuloimaa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista synaptosomeista, voidaan todeta, ettei vaikutus todennäköisimmin välittynyt presynaptisten opioidireseptorien kautta.

Suoraa presynaptista vaikutusta todennäköisempi opioidireseptorit sisällyttävä selitys morfiinin kyvyllä stimuloida [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista olisi vaikutuksen välittyminen opioidireseptorien kautta epäsuorasti. Tällaisessa tapauksessa nikotiinireseptorien aktivaatio seuraisi morfiinin opioidireseptorivälitteistä, kolinergista aktiivisuutta tehostavaa vaikutusta. Tämä selittäisi myös nikotiiniantagonistien inhiboivat vaikutukset. Synaptosomiperfuusiomenetelmiä pidetään suhteellisen epäherkkinä epäsuorille vaikutuksille, sillä synaptosomit sisältävät pääasiassa presynaptisia reseptoreita ja jatkuvat perfuusio-olosuhteet kuljettavat esimerkiksi muut vapautuneet välittäjäaineet nopeasti pois (Raiteri ja Raiteri 2000). Toisaalta yksi selitys vaikutuksiin vaadituille korkeille opioidipitoisuuksille voisi teoriassa olla epäsuora vaikutus, josta valtaosa häviää perfuusion johdosta. Hypoteettinen epäsuora vaikutus voisi mahdollisesti välittyä kolinergisten interneuronien vapauttaman asetyylikoliinin kautta. Striatumin kolinergisissa interneuroneissa esiintyy opioidireseptoreita, mutta niiden vaikutus aivoleikkeissä on kuitenkin asetyylikoliinin vapautumista inhiboiva (Kuva 7; Britt ja McGehee 2008), eivätkä ainakaan accumbens-tumakkeen interneuronien  $\mu$ -reseptorit sijaitse presynaptisesti kuin pienessä osassa interneuroneja (Svingos ym. 2001b). Lisäksi epäsuorakaan vaikutus ei selitä naloksonin kykyä inhiboida kummankin agonistin stimuloimaa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista, sillä nikotiinin stimuloimaa vapautumista koskeva kirjallisuus ei anna syytä epäillä nikotiinin vaikutuksen välittyvän opioidireseptorien kautta. Morfiinin hypoteettisen epäsuoran opioidireseptorivälitteisen vaikutuksen estämiseen tarvittavan naloksonipitoisuuden voisi myös odottaa olevan naloksonin opioidireseptoriaffiniteetin luokkaa eikä poikkeuksellisen korkea kuten tässä tutkimuksessa. Kaiken kaikkiaan voidaan siis todeta, että nykyisen tutkimustiedon valossa opioidireseptorien kautta välittyvät vaikutukset eivät todennäköisimmin olleet tässä tutkimuksissa havaittujen opioidivasteiden taustalla.

Korkeiden pitoisuuksien aiheuttamia epäspesifisiä vaikutuksia on vaikea poissulkea. Tutkimuksessa käytetyt pitoisuudet ovat huomattavan korkeita, ja tutkitut opioidit saattoivat vaikuttaa [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumiseen mekanismilla, joka ei liittynyt nikotiinireseptorien aktivoitumiseen niiden fysiologista toimintaa muistuttavalla tavalla. Erikoinen sattuma olisi, että opioidiagonisti morfiinin epäspesifiset vaikutukset stimuloisivat [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista opioidiantagonisti naloksonin puolestaan inhiboidessa vapautumista. Toisaalta vähintäänkin yhtä erikoisena voidaan pitää sitä, että morfiini ja rakenteellisesti sitä suuresti muistuttava naloksoni näyttäisivät vaikuttavan opioidireseptoreista merkittävästi eroaviin nikotiinireseptoreihin säilyttäen kuitenkin vastaavat agonistiset ja antagonistiset ominaisuutensa. Reseptoritason opioidi-nikotiini-interaktioiden molekyyli-tason mekanismit ovat kuitenkin toistaiseksi tuntemattomat, joten perusteltuja johtopäätöksiä on vaikea tehdä.

Nikotiinin ja morfiinin stimuloima [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautuminen synaptosomeista oli vain osittain estettävissä  $\alpha$ -konotoksiini MII:lla. Tätä ilmiötä hyödynnettiin aiemman tutkimuksen (Salminen ym. 2004) tapaan suorittamalla perfuusion yhteydessä osalle synaptosomeista 50 nM  $\alpha$ -CTX MII -esikäsitely. Esikäsitellyistä ja esikäsittelemättömistä synaptosomeista vapautuneiden [<sup>3</sup>H]dopamiinimäärien perusteella määritettiin kummankin agonistin stimuloiman vapautumisen  $\alpha$ -CTX MII -herkät ja  $\alpha$ -CTX MII -resistentit komponentit ja eri komponenttien herkkyys kyseiselle agonistille ja eri antagonisteille. Nikotiinikokeiden tuloksia verrattiin aiempaan samalla menetelmällä suoritettuun tutkimukseen (Salminen ym. 2004). Nikotiini stimuloi sekä  $\alpha$ -CTX MII -resistenttiä että  $\alpha$ -CTX MII -herkkää [<sup>3</sup>H]dopamiinivapautumista voimakkaammin ( $EC_{50} = 94$  tai  $84$  nM) kuin aiemmassa tutkimuksessa ( $EC_{50} = 1610$  nM tai  $770$  nM). Tämä saattaa johtua esimerkiksi hienovaraisista eroista perfuusiolaitteistossa tai toimintatavoissa. Mahdollisesti edellistä heijastaen nikotiinin stimuloiman vapautumisen eri komponenttien estoon vaadittavat DH $\beta$ E-pitoisuudet olivat korkeampia tässä tutkimuksessa ( $IC_{50} = 1,42$   $\mu$ M tai  $7,28$   $\mu$ M) kuin aiemmassa tutkimuksessa ( $IC_{50} = 0,14$   $\mu$ M tai  $1,86$   $\mu$ M). Sen sijaan nikotiinin vaikutuksen komponenttien estämiseen vaadittavat MLA-pitoisuudet olivat osapuilleen samaa luokkaa sekä tässä tutkimuksessa ( $IC_{50} = 40,7$   $\mu$ M tai  $10,8$   $\mu$ M) että aiemmassa tutkimuksessa ( $IC_{50} = 30,3$   $\mu$ M tai  $8,32$   $\mu$ M).

Sekä nikotiinin että morfiinin tapauksessa agonisti stimuloi sekä  $\alpha$ -CTX MII -herkkää että  $\alpha$ -CTX MII -resistenttiä [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista yhtä voimakkaasti (ts.  $EC_{50}$  -arvojen välillä ei ollut eroa). Nikotiinin osalta tämä poikkeaa aiemmasta tutkimuksesta, jossa  $\alpha$ -CTX MII -herkän vapautumisen stimuloimiseen tarvittavien nikotiiniagonistipitoisuuksien havaittiin olevan pienempiä kuin  $\alpha$ -CTX MII -resistentin vapautumisen stimulaatioon tarvittavat pitoisuudet (Salminen ym. 2004). Poikkeavan tuloksen syy on tuntematon, mutta voi liittyä nikotiiniin ylipäättään voimakkaampaan vaikutukseen tässä tutkimuksessa. Eroja vapautumisen komponenttien herkkyydessä eri antagonisteille puolestaan oli löydettävissä kummankin agonistin tapauksessa. Nikotiinin stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinivapautumisen  $\alpha$ -CTX MII -herkkä komponentti oli herkempi MLA:n inhiboivalle vaikutukselle, kun taas  $\alpha$ -CTX MII -resistentti komponentti oli herkempi DH $\beta$ E:n inhiboivalle vaikutukselle. Tämä vastaa aiemman tutkimuksen tuloksia (Salminen ym. 2004), ja kuvastaa todennäköisesti eroja vapautumisen komponenttien taustalla olevissa nikotiinireseptoripopulaatioissa. Morfiinin stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen  $\alpha$ -CTX MII -resistentti komponentti oli nikotiinin tapaan herkempi DH $\beta$ E:n inhiboivalle vaikutukselle, mutta komponenttien välillä ei ollut eroa herkkyydessä MLA:lle. Sekä nikotiinin että morfiinin tapauksessa havaittua samankaltaista eroa vapautumisen komponenttien DH $\beta$ E-herkkyydessä voinee varauksin pitää lisänäyttönä agonistien vaikutusten välittymisestä samankaltaisten reseptoripopulaatioiden kautta. Toisaalta ainostaan nikotiinin stimuloiman vapautumisen komponenttien välillä oli eroa niiden herkkyydessä MLA:lle, mikä viittaisi eroihin nikotiinin ja morfiinin aktivoimissa reseptoripopulaatioissa. Vapautumisen eri komponentteihin liittyviä tuloksia tulkittaessa on kuitenkin puututtava myös tutkimuksessa ilmaantuneeseen  $\alpha$ -CTX MII -esikäsitelyyn liittyvään menetelmälliseen ongelmaan.

Tarkasteltaessa  $\alpha$ -CTX MII:n annosvastekokeiden tuloksia (Taulukko 1B) havaitaan, että vaikka yhdisteelle määritetty keskimääräinen  $IC_{50}$ -arvo (3,4–3,5 nM) oli varsin lähellä aiempia nikotiinia käyttäneitä synaptosomitutkimuksia (2 nM, Grady ym. 2002; 2,2 nM, Salminen ym. 2004; n. 3 nM, Salminen ym. 2007), parametrin hajonta oli hyvin suuri kummankin agonistin stimuloimaa vapautumista estettäessä. Vastaavasti [ $^3$ H]dopamiinivapautumisen eri komponenttien  $EC_{50}/IC_{50}$ -arvoja (Taulukko 2)

tarkasteltaessa on havaittavissa, että erityisesti vapautumisen  $\alpha$ -CTX MII -herkän komponentin parametrien hajonta oli varsin suurta kautta tutkimuksen. Yksittäisten koe-eläinten annosvastetulosten (ei esitetty tässä) perusteella voidaan havaita eri koe-eläimistä valmistettujen synaptosomien  $\alpha$ -CTX MII -herkkyden vaihdelleen suuresti ja ajoittain jopa saman koepäivän sisällä, kun taas samasta eläimestä valmistettujen synaptosomien herkkyys yhdisteelle ei vaikuttanut vaihtelevan perfuusiokokeesta toiseen. Näin ollen on todettava, että todennäköisesti osassa synaptosominäytteitä  $\alpha$ -CTX MII -esikäsittely kirjallisuuden perusteella valitulla 50 nM pitoisuudella (Salminen ym. 2004) ei estänyt kaikkea  $\alpha$ -CTX MII -herkkää [ $^3$ H]dopamiinin vapautumista. Tähän viittaa myös se, että annosvastekokeissa  $\alpha$ -CTX MII:n maksimaaliseksi inhibitioasteeksi määritettiin 50 % nikotiinin stimuloimasta [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisesta, mutta 50 nM esikäsittely esti keskimäärin vain 30 % nikotiinin stimuloimasta vapautumisesta. Erittäin valitettavasti ilmiön luonteen paljastaneet  $\alpha$ -CTX MII -annosvastekokeet suoritettiin epähuomiossa vasta tämän tutkimuksen loppuvaiheessa, jolloin valtaosa muista kokeista oli jo tehty. Eräs mahdollisesti asiaan vaikuttanut muutos aiempaan tutkimukseen verrattuna (Salminen ym 2004, Salminen ym 2007) oli  $\alpha$ -CTX MII -esikäsittelyn lyhentäminen viidestä minuutista kolmeen minuuttiin yhdisteen kulutuksen vähentämiseksi. Lienee esimerkiksi mahdollista, että lyhempi esikäsittely johti epätäydelliseen  $\alpha$ -CTX MII -herkkien reseptorien inhibitioon, joka vuorostaan aiheutti koe-eläinten yksilöllisten erojen korostumisen. Toistaiseksi on kuitenkin epäselvää, johtuiko  $\alpha$ -CTX MII -herkkyden vaihtelu todellisista yksilöllisistä eroista hiirten välillä vaiko yhden tai useamman koeolosuhteisiin liittyvän tekijän huomaamatta jääneestä vaihtelusta. Joka tapauksessa edellä kuvattuihin agonistien stimuloiman [ $^3$ H]dopamiinin vapautumisen eri komponentteihin liittyviin tuloksiin lienee syytä suhtautua kriittisesti, ja pidemmälle menevien johtopäätösten tekeminen on vaikeaa. Lisäksi laitteiston tulevan käytön kannalta olisi tärkeää selvittää herkkyden vaihtelun tarkka syy ja tarvittaessa esimerkiksi lisätä vastaisuudessa esikäsittelyaikaa tai -pitoisuutta. Esikäsittelyssä käytetyn  $\alpha$ -CTX MII -määrän lisääminen ei toisaalta tässä tutkimuksessa olisi välttämättä ollut mahdollistakaan, sillä yhdisteen kaupallinen saatavuus on rajoitettua hyvin korkean hinnan johdosta, ja lahjoituksena saadun yhdisteen kulutus oli jo käytetyillä määrilläkin huomattavan suuri.



Tässä tutkimuksessa havaitut viitteet morfiinin presynaptisia nikotiinireseptoreita aktivoivista vaikutuksista ovat mielenkiintoisia, mutta vaikutuksiin vaaditut korkeat morfiinipitoisuudet asettavat niiden kliinisen ja fysiologisen merkityksen jokseenkin kyseenalaiseksi. Tupakoinnin jälkeen mitattu veren keskimääräinen nikotiinipitoisuus vaihtelee välillä 62–245 nM (Schneider ym. 2001), joten tupakoimalla saavutetaan esimerkiksi tässä tutkimuksessa määritetty nikotiinin dopamiinin vapautumiseen vaikuttava pitoisuustaso ( $EC_{50} = 93$  nM), ja presynaptisten reseptorien kautta välittyvillä nikotiinin vaikutuksilla voidaan perustellusti esittää olevan kliinistä ja/tai fysiologista merkitystä. Sen sijaan morfiinin dopamiinin vapautumiseen vaikuttanut pitoisuustaso ( $EC_{50} = 185$   $\mu$ M) on monta kertaluokkaa korkeampi kuin esimerkiksi syöpäkipu-potilaiden verestä mitatut morfiinipitoisuudet (28–792 nM; Sakurada ym. 2010) ja kymmenkertainen verrattuna jopa korkeimpiin morfiiniyliannostukseen menehtyneiden henkilöiden verestä mitattuihin pitoisuuksiin (14  $\mu$ M; Winek ym. 2001). Tämä ei sinänsä ole yllättävää ottaen huomioon morfiinin nanomolaarisen affiniteetin sen pääasialliseen vaikutuskohteeseen eli  $\mu$ -opioidireseptoreihin, mutta tarkoittanee tässä tutkimuksessa kuvattujen morfiinin vaikutusten olevan käytännössä merkityksettömiä koko elimistön tasolla. Sama huomautus koskee myös tuloksia, jotka viittaavat korkeiden naloksonipitoisuuksien nikotiinireseptoreita salpaaviin vaikutuksiin. On kuitenkin huomattava, että eksogeenisena ligandina morfiinin vaikutukset eivät välttämättä vastaa endogeenisten opioidiagonistien vaikutuksia. Periaatteessa on siis mahdollista, että tutkimuksessa havaitun kaltaisilla reseptoritason opioidi-nikotiini-interaktioilla olisi yhdessä opioidineuropeptidien muiden vaikutusmekanismien kanssa jokin fysiologinen rooli esimerkiksi dopamiinin vapautumisen säätelyssä. Lisäksi muiden kuin nyt tutkittujen opioidien vaikutukset voisivat mahdollisesti ilmaantua jo alhaisemmilla ja kliinisesti merkittävämmillä pitoisuustasoilla.

Morfiinin nikotiinireseptorivälitteiseen striataalista dopamiinin vapautumista stimuloivaan vaikutukseen viittaavat kiintoisat tulokset, samoin kuin tuloksiin liittyvät epäselvyydet, herättävät monia uusia kysymyksiä. Mahdollista onkin esittää lukuisia lisätutkimuksen kohteita. Ensinnäkin tärkeää lisätietoa voitaisiin saada tutkimalla muiden opioidiagonistien ja -antagonistien vaikutuksia [ $^3$ H]dopamiinin vapautumiseen striataalisista synaptosomeista. Selektiivisempien opioidiligandien käyttö voisi

edesauttaa havaitsemaan tai poissulkemaan mahdollisia eri opioidireseptorien kautta välittyviä [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista stimuloivia vaikutuksia. Kiinnostavaa voisi olla tutkia myös esimerkiksi mahdollisen kolinergisten hermopäätteiden kautta välittyvän epäsuoran vaikutuksen osuutta [<sup>3</sup>H]asetylikoliinin vapautumiskokein. Endogeenisten opioididiagonistien mahdollisesti stimuloiman välittäjäaineiden vapautumisen tutkiminen voisi puolestaan tuoda lisävalaistusta kysymykseen tässä tutkimuksessa havaitun opioidi-nikotiini-interaktion fysiologisesta merkittävydestä. Lisäksi huomattavasti resursseja vaativa mutta kiinnostava tutkimusaihe olisi eri nikotiinireseptorityyppien roolin tarkempi selvittäminen havaitussa ilmiössä poistogeenisiä hiiriä hyödyntäen. Myös olisi mahdollista tutkia esimerkiksi kroonisen nikotiini- tai opioidialtistuksen vaikutusta opioidien tai nikotiinin stimuloimaan [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumiseen ja selvittää muun muassa, onko nikotiinin tapaan myös opioideilla nikotiinireseptoreita epäherkistäviä vaikutuksia. Striatumin dorsaalisen ja ventraalisen osan tarkempi erottelu ja niiden erojen tutkimus saattaisi niin ikään tuottaa mielenkiintoisia tuloksia, sillä opioidien vaikutuksia on tutkittu erityisen paljon nimenomaisesti accumbens-tumakkeessa. Striatumin osa-alueiden välillä on myös havaittu paljon eroavaisuuksia sekä opioidi- että nikotiinivasteissa. Myös opioidien vaikutukset kaliumilla tai sähköisesti stimuloituun välittäjäaineiden vapautumiseen synaptosomeista voisivat olla kiintoisa tutkimusaihe, erityisesti kun otetaan huomioon ainakin accumbens-tumakkeessa esiintyvät dopamiinihermopäätteiden presynaptiset  $\delta$ - ja  $\kappa$ -opioidireseptorit, joiden vaikutus on pääasiassa dopamiinin vapautumista inhiboiva mutta osittain epäselvä erityisesti  $\delta$ -reseptorien tapauksessa.

Muista kuin synaptosomimenetelmistä mainittakoon, että tutkimalla opioidien kykyä syrjäyttää radioleimattu nikotiiniagonisti koe-eläimen striatumista valmistetuista solukalvohomogenaateista voisi olla mahdollista saada suhteellisen helposti lisänäyttöä opioidien ja luonnollisesti ilmentyvien nikotiinireseptorien vuorovaikutuksista. Toisaalta esimerkiksi aivoleikkeitä käyttäen voitaisiin pyrkiä selvittämään, onko opioidien mahdollisilla suorilla nikotiinireseptorivaikutuksilla osuutta  $\mu$ - ja  $\delta$ -opioididiagonistien nikotiinia muistuttavaan, dopamiinihermosolun aktiivisuustason mukaisesti vaihtelevaan dopamiinin vapautumista säätelevään vaikutukseen (Britt ja McGehee 2008; Exley ja Cragg 2008). Lopuksi esitettäkään lähinnä eksploraatiivisen

tutkimuksen kategoriaan kuuluva tutkimusidea sen selvittämisestä, voisiko myös muilla riippuvuutta aiheuttavilla ja/tai striatumin dopaminergiseen hermovälitykseen vaikuttavilla yhdisteillä kuin nikotiinilla ja opioideilla olla presynaptisten nikotiinireseptorien kautta välittyviä vaikutuksia dopamiinin vapautumiseen striatumissa.

## 7. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessa todettiin sekä nikotiinin että morfiinin stimuloivan annosriippuvaisesti [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumista hiiren perfusoiduista striataalisista synaptosomeista. Kyseessä oli ensimmäinen tässä laboratoriossa suoritettu synaptosomiperfuusio-tutkimus. Nikotiinin stimuloimaa vapautumista koskevat tulokset vastaavat pääosin aiemmin raportoituja tuloksia, joskin synaptosomit olivat aiemmin havaittua herkempiä nikotiinin vaikutuksille. Tutkimusmenetelmän voidaan siis todeta toimineen halutulla tavalla lukuun ottamatta pohdinnassa kuvattua menetelmällistä ongelmaa. Morfiinin stimuloiman [<sup>3</sup>H]dopamiinin vapautumisen havaittiin olevan kumottavissa nikotiiniantagonisteilla, mikä viittaa vaikutuksen välittymiseen striatumin dopamiinihermopäätteiden presynaptisten nikotiinireseptorien kautta. Määritettyjen antagonistien vasteprofiilien perusteella voidaan esittää morfiinin vaikutuksen välittyneen ainakin osittain saman nikotiinireseptoripopulaation kautta kuin nikotiinin vaikutuksen. Lisäksi voidaan esittää kyseisen reseptoripopulaation koostuvan vähintäänkin kahden eri tyypin nikotiinireseptoreista, joista toiset ovat  $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptoreita ja toiset ei- $\alpha 6\beta 2^*$ -reseptoreita (mahdollisesti  $\alpha 4\beta 2^*$ ).

Morfiinin nikotiinia muistuttavat vaikutukset, jotka havaittiin tutkittaessa aiemmin perusteellisesti karakterisoitua [<sup>3</sup>H]dopamiinin nikotiinireseptorivälitteistä vapautumista striataalisista synaptosomeista, tukevat aiempia tuloksia reseptoritason opioidi-nikotiini-interaktioista ja laajentavat niitä koskemaan myös luonnollisesti ilmentyviä hiiren nikotiinireseptoreita. Vastaavasti havaittiin opioidiantagonisti naloksonin estävän paitsi morfiinin myös nikotiinin vaikutuksia, mikä tukee aiempia tuloksia naloksonin nikotiinireseptoreita inhiboivista vaikutuksista. Opioidireseptorien kautta välittyviä

epäsuoria vaikutuksia tai korkeiden morfiini- ja naloksonipitoisuuksien epäspesifejä vaikutuksia ei kuitenkaan voitu täysin poissulkea.

Viitteet opioidien suoraan presynaptisten nikotiinireseptorien kautta välittyistä vaikutuksista striataaliseen dopamiinin vapautumiseen ovat hyvin mielenkiintoisia, kun otetaan huomioon laaja kirjallisuus opioidi-nikotiini-interaktioista ja erityisesti yhdisteiden samantapaisista vaikutuksista striatumin dopamiinihermovälitykseen. Toisaalta tulosten kliininen ja fysiologinen merkittävyys on kyseenalainen, sillä morfiinin ja naloksonin vaikutukset ilmaantuivat vasta hyvin korkeilla pitoisuuksilla. On kuitenkin mahdollista, että esimerkiksi muiden opioidilääkeaineiden tai endogeenisten opioidiligandien ja striatumin presynaptisten nikotiinireseptorien väliset interaktiot voisivat osallistua dopamiinin vapautumisen säätelyyn fysiologisesti merkittävällä tavalla. Asian selvittäminen saattaisi tuottaa tärkeää lisätietoa liittyen muun muassa riippuvuuden muodostumisen ja motorisen toiminnan striataalisiin säätelymekanismeihin.

## 8. KIRJALLISUUSLUETTELO

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW: Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89: 73–120, 2009

Alkondon M, Albuquerque EX: A non- $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor modulates excitatory input to hippocampal CA1 interneurons. *J Neurophysiol* 87: 1651–1654, 2002

Alkondon M, Reinhardt S, Lobron C, Hermsen B, Maelicke A, Albuquerque EX: Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. II. The rundown and inward rectification of agonist-elicited whole-cell currents and identification of receptor subunits by in situ hybridization. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 494–506, 1994

Alkondon M, Pereira EFR, Barbosa CTF, Albuquerque EX: Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates  $\gamma$ -aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1396–1411, 1997

Alkondon M, Pereira EFR, Albuquerque EX:  $\alpha$ -Bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res* 810: 257–263, 1998

Alkondon M, Pereira EFR, Eisenberg HM, Albuquerque EX: Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 19: 2693–2705, 1999

Alkondon M, Pereira EFR, Eisenberg HM, Albuquerque EX: Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: a mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks. *J Neurosci* 20: 66–75, 2000

Alkondon M, Pereira EFR, Albuquerque EX: NMDA and AMPA receptors contribute to the nicotinic cholinergic excitation of CA1 interneurons in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 90: 1613–1625, 2003

Alkondon M, Pereira EFR, Albuquerque EX: Endogenous activation of nAChRs and NMDA receptors contributes to the excitability of CA1 stratum radiatum interneurons in rat hippocampal slices: effects of kynurenic acid. *Biochem Pharmacol* 82: 842–851, 2011

Almeida LEF, Pereira EFR, Alkondon M, Fawcett WP, Randall WR, Albuquerque EX: The opioid antagonist naltrexone inhibits activity and alters expression of  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors in hippocampal neurons: implications for smoking cessation programs. *Neuropharm* 39: 2740–2755, 2000

Alvarez JA, Emory E: Executive function and the frontal lobes: a meta-analytic review. *Neuropsychol Rev* 16: 17–42, 2006

Amtage F, Neugebauer B, McIntosh JM, Freiman T, Zentner J, Feuerstein TJ, Jackisch R: Characterization of nicotinic receptors inducing noradrenaline release and absence of nicotinic autoreceptors in human neocortex. *Brain Res Bull* 62: 413–423, 2004

Anderson DJ, Puttfarcken PS, Jacobs I, Faltynek C: Assessment of nicotinic acetylcholine receptor-mediated release of [ $^3$ H]-norepinephrine from rat brain slices using a new 96-well format assay. *Neuropharm* 39: 2663–2672, 2000

Anderson DJ, Malysz J, Grønlien JH, El Kouhen R, Håkerud M, Wetterstrand C, Briggs CA, Gopalakrishnan M: Stimulation of dopamine release by nicotinic acetylcholine receptor ligands in rat brain slices correlates with the profile of high, but not low, sensitivity  $\alpha 4\beta 2$  subunit combination. *Biochem Pharmacol* 78: 844–851, 2009

Aracri P, Consonni S, Morini R, Perrella M, Rodighiero S, Amadeo A, Becchetti A: Tonic modulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in layer V of the murine prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 20: 1539–1555, 2010

Avshalumov MV, Patel JC, Rice ME: AMPA receptor-dependent  $H_2O_2$  generation in striatal medium spiny neurons but not dopamine axons: one source of a retrograde signal that can inhibit dopamine release. *J Neurophysiol* 100: 1590–1601, 2008

Azam L, McIntosh JM: Characterization of nicotinic acetylcholine receptors that modulate nicotine-evoked [<sup>3</sup>H]norepinephrine release from mouse hippocampal synaptosomes. *Mol Pharmacol* 70: 967–976, 2006

Azam L, Winzer-Serhan UH, Chen Y, Leslie FM: Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol* 444: 260–274, 2002

Azam L, Winzer-Serhan U, Leslie FM: Co-expression of  $\alpha 7$  and  $\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience* 119: 965–977, 2003

Azam L, Maskos U, Changeux J, Dowell CD, Christensen S, De Biasi M, McIntosh JM:  $\alpha$ -Conotoxin BuIA [T5A; P6O]: a novel ligand that discriminates between  $\alpha 6\beta 4$  and  $\alpha 6\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors and blocks nicotine-stimulated norepinephrine release. *FASEB J* 24: 5113–5123, 2010

Aznar S, Kostova V, Christiansen SH, Knudsen GM:  $\alpha 7$  nicotinic receptor subunit is present on serotonin neurons projecting to hippocampus and septum. *Synapse* 55: 196–200, 2005

Bals-Kubik R, Ableitner A, Herz A, Shippenberg TS: Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 489–495, 1993

Bamford NS, Robinson S, Palmiter RD, Joyce JA, Moore C, Meshul CK: Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J Neurosci* 24: 9541–9552, 2004

Bancila V, Cordeiro JM, Bloc A, Dunant Y: Nicotine-induced and depolarisation-induced glutamate release from hippocampus mossy fibre synaptosomes: two distinct mechanisms. *J Neurochem* 110: 570–580, 2009

Barik J, Wonnacott S: Indirect modulation by  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors of noradrenaline release in rat hippocampal slices: interaction with glutamate and GABA systems and effect of nicotine withdrawal. *Mol Pharmacol* 69: 618–628, 2006

Benarroch EE: Effects of acetylcholine in the striatum. Recent insights and therapeutic implications. *Neurology* 79: 274–281, 2012

Benowitz NL: Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 597–613, 1996

Bernard V, Bolam JP: Subcellular and subsynaptic distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the neostriatum and globus pallidus of the rat: co-localization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. *Eur J Neurosci* 10: 3721–3736, 1998

Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R: Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in  $\mu$ -opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22: 10935–10940, 2002

Besson M, David V, Baudonnat M, Cazala P, Guilloux J, Reperant C, Cloez-Tayarani I, Changeux J, Gardier AM, Granon S: Alpha7-nicotinic receptors modulate nicotine-induced reinforcement and extracellular dopamine outflow in the mesolimbic system in mice. *Psychophar* 220: 1–14, 2012

Biala G, Weglinska B: Calcium channel antagonists attenuate cross-sensitization to the rewarding and/or locomotor effects of nicotine, morphine and MK-801. *J Pharm Pharmacol* 56: 1021–1028, 2004

Björklund A, Dunnett SB: Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30: 194–202, 2007

Blake AD, Bot G, Freeman JC, Reisine T: Differential opioid agonist regulation of the mouse  $\mu$  opioid receptor. *J Biol Chem* 272: 782–790, 1997

Brazell MP, Mitchell SN, Gray JA: Effect of acute administration of nicotine on in vivo release of noradrenaline in the hippocampus of freely moving rats: A dose-response and antagonist study. *Neuropharm* 30: 823–833, 1991

Britt JP, McGehee DS: Presynaptic opioid and nicotinic receptor modulation of dopamine overflow in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 28: 1672–1681, 2008

Brown RW, Collins AC, Lindstrom JM, Whiteaker P: Nicotinic  $\alpha 5$  subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *J Neurochem* 103: 204–215, 2007

Burns R (toim.): *Immunochemical Protocols*. 3. painos. Humana Press Inc., Totowa NJ 2005

Campos F, Alfonso M, Durán R: In vivo modulation of  $\alpha 7$  nicotinic receptors on striatal glutamate release induced by anatoxin-A. *Neurochem Int* 56: 850–855, 2010

Cao Y, Surowy CS, Puttfarcken PS: Different nicotinic acetylcholine receptor subtypes mediating striatal and prefrontal cortical [ $^3$ H]dopamine release. *Neuropharm* 48: 72–79, 2005a

Cao Y, Surowy CS, Puttfarcken PS: Nicotinic acetylcholine receptor-mediated [ $^3$ H]dopamine release from hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 1298–1304, 2005b

Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, Luo S, Olivera BM, McIntosh JM: A new  $\alpha$ -conotoxin which targets  $\alpha 3\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 271: 7522–7528, 1996

Chai XJ, Whitfield-Gabrieli S, Shinn AK, Gabrieli JDE, Castañón AN, McCarthy JM, Cohen BM, Öngür D: Abnormal medial prefrontal cortex resting-state connectivity in bipolar disorder and schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 36: 2009–2017, 2011

Champtiaux N, Han Z, Bessis A, Rossi FM, Zoli M, Marubio L, McIntosh JM, Changeux J: Distribution and pharmacology of  $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice. *J Neurosci* 22: 1208–1217, 2002

Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Léna C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux J: Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23: 7820–7829, 2003

Changeux J: Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci* 11: 389–401, 2010

Changeux J, Edelstein SJ: Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* 308: 1424–1428, 2005

Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Johnson EC: Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 4$  and  $\alpha 7$  expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 346–356, 1997

Chefer VI, Kieffer BL, Shippenberg TS: Basal and morphine-evoked dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens of MOR- and DOR-knockout mice. *Eur J Neurosci* 18: 1915–1922, 2003

Clark M: Self-administered nicotine solutions preferred to placebo by the rat. *Br J Pharmacol* 35: 367P, 1969

Clarke PBS, Reuben M: Release of [ $^3$ H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [ $^3$ H]-dopamine release. *Br J Pharmacol* 117: 595–606, 1996

Clarke PBS, Schwartz RD, Paul SM, Pert CB, Pert A: Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [ $^3$ H]acetylcholine, [ $^3$ H]nicotine, and [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -bungarotoxin. *J Neurosci* 5: 1307–1315, 1985

Collins AC, Salminen O, Marks MJ, Whiteaker P, Grady SR: The road to discovery of neuronal nicotinic cholinergic receptor subtypes. Kirjassa: Nicotine psychopharmacology, s. 85. Toim. Henningfield JE, London ED, Pogun S, Springer-Verlag, Berliini 2009

Commons KG: Alpha4 containing nicotinic receptors are positioned to mediate postsynaptic effects on 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 153: 851–859, 2008



Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL, Chow BLC, Zhang J: Response of nicotine self-administration in the rat to manipulations of mu-opioid and  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors in the ventral tegmental area. *Psychophar* 149: 107–114, 2000

Couey JJ, Meredith RM, Spijker S, Poorthuis RB, Smit AB, Brussaard AB, Mansvelder HD: Distributed network actions by nicotine increase the threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex. *Neuron* 54: 73–87, 2007

Cuello AC (toim.): *Brain Microdissection Techniques*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken NJ 1983

Cui C, Booker T, Allen RS, Grady SR, Whiteaker P, Marks MJ, Salminen O, Tritto T, Butt CM, Allen WR, Stitzel JA, McIntosh JM, Boulter J, Collins AC, Heinemann SF: The  $\beta$ 3 nicotinic receptor subunit: a component of  $\alpha$ -conotoxin MII-binding nicotinic acetylcholine receptors that modulate dopamine release and related behaviors. *J Neurosci* 23: 11045–11053, 2003

Dajas-Bailador F, Wonnacott S: Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25: 317–324, 2004

Damaj MI, Flood P, Ho KK, May EL, Martin BR: Effect of dextrometorphan and dextrorphan on nicotine and neuronal nicotinic receptors: in vitro and in vivo selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 780–785, 2005

Dani JA, Balfour DJK: Historical and current perspective on tobacco use and nicotine addiction. *Trends Neurosci* 34: 383–392, 2011

Dani JA, Bertrand D: Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 699–729, 2007

David V, Besson M, Changeux J, Granon S, Cazala P: Reinforcing effects of nicotine microinjections into the ventral tegmental area of mice: dependence on cholinergic nicotinic and dopaminergic D1 receptors. *Neuropharm* 50: 1030–1040, 2006

Davies ARL, Hardick DJ, Blagbrough IS, Potter BVL, Wolstenholme AJ, Wonnacott S: Characterisation of the binding of [ $^3$ H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling  $\alpha$ 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharm* 38: 679–690, 1999

De Rover M, Lodder JC, Kits KS, Schoffelmeer ANM, Brussaard AB: Cholinergic modulation of nucleus accumbens medium spiny neurons. *Eur J Neurosci* 16: 2279–2290, 2002

Descarries L, Audet MA, Doucet G, Garcia S, Oleskevich S, Séguéla P, Soghomonian J, Watkins KC: Morphology of central serotonin neurons. *Ann NY Acad Sci* 600: 81–92, 1990

- Desce JM, Godeheu G, Galli T, Artaud F, Cheramy A, Glowinski J: l-Glutamate-evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum: Involvement of AMPA and N-methyl-d-aspartate receptors. *Neuroscience* 47: 333–339, 1992
- Devine DP, Wise RA: Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* 14: 1978–1984, 1994
- Dhatt RK, Gudehithlu KP, Wemlinger TA, Tejwani GA, Neff NH, Hadjiconstantinou M: Preproenkephalin mRNA and methionine-enkephalin content are increased in mouse striatum after treatment with nicotine. *J Neurochem* 64: 1878–1883, 1995
- Di Chiara G, Imperato A: Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcranial dialysis in freely moving rats. *Ann NY Acad Sci* 473: 367–381, 1986
- Di Chiara G, Imperato A: Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 1067–1080, 1988a
- Di Chiara G, Imperato A: Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5274–5278, 1988b
- Dickinson JA, Kew JNC, Wonnacott S: Presynaptic  $\alpha 7$ - and  $\beta 2$ -containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* 74: 348–359, 2008
- Doig NM, Moss J, Bolam JP: Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci* 30: 14610–14618, 2010
- Dos Santos Coura R, Granon S: Prefrontal neuromodulation by nicotinic receptors for cognitive processes. *Psychophar* 221: 1–18, 2012
- Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH: Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952–1955, 1992
- Exley R, Cragg S: Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br J Pharmacol* 153: S283–S297, 2008
- Exley R, Clements MA, Hartung H, McIntosh JM, Cragg SJ:  $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors dominate the nicotine control of dopamine neurotransmission in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacol* 33: 2158–2166, 2008
- Exley R, McIntosh JM, Marks MJ, Maskos U, Cragg SJ: Striatal  $\alpha 5$  nicotinic receptor subunit regulates dopamine transmission in dorsal striatum. *J Neurosci* 32: 2352–2356, 2012

- Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, Fine A: Ultrastructural distribution of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci* 21: 7993–8003, 2001
- Faria M, Oliveira L, Timóteo MA, Lobo MG, Correia-de-sá P: Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing  $\alpha 3\beta 2$  subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm. *Synapse* 49: 77–88, 2003
- Fisher JL, Pidoplichko VI, Dani JA: Nicotine modifies the activity of ventral tegmental area dopaminergic neurons and hippocampal GABAergic neurons. *J Physiol Paris* 92: 209–213, 1998
- Flores CM, DeCamp RM, Kilo S, Rogers SW, Hargreaves KM: Neuronal nicotinic receptor expression in sensory neurons of the rat trigeminal ganglion: demonstration of  $\alpha 3\beta 4$ , a novel subtype in the mammalian nervous system. *J Neurosci* 16: 7892–7901, 1996
- Floresco SB, Magyar O: Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychophar* 188: 567–585, 2006
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G: Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63: 844–914, 1983
- Frazier CJ, Buhler AV, Weiner JL, Dunwiddie TV: Synaptic potentials mediated via  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J Neurosci* 18: 8228–8235, 1998
- Fu Y, Matta SG, James TJ, Sharp BM: Nicotine-induced norepinephrine release in the rat amygdala and hippocampus is mediated through brainstem nicotinic cholinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 1188–1196, 1998
- Fucile S, Renzi M, Lax P, Eusebi F: Fractional  $\text{Ca}^{2+}$  current through human neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calc* 34: 205–209, 2003
- Fudala PJ, Teoh KW, Iwamoto ET: Pharmacologic characterization of nicotine-induced conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 237–241, 1985
- Galindo-Charles L, Hernandez-Lopez S, Galarraga E, Tapia D, Bargas J, Garduño J, Frías-Dominguez C, Drucker-Colin R, Mihailescu S: Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 62: 601–615, 2008
- Gioanni Y, Rougeot C, Clarke PBS, Lepouse C, Thierry AM, Vidal C: Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur J Neurosci* 11: 18–30, 1999

- Giorguieff-Chesselet M, Kemel M, Wandscheer D, Glowinski J: Regulation of dopamine release by presynaptic nicotinic receptors in rat striatal slices: effect of nicotine in a low concentration. *Life Sci* 25: 1257–1261, 1979
- Gittis AH, Kreitzer AC: Striatal microcircuitry and movement disorders. *Trends Neurosci* 2012
- Goldberg S, Spealman R, Goldberg D: Persistent behavior at high rates maintained by intravenous self-administration of nicotine. *Science* 214: 573–575, 1981
- Goldstein RZ, Volkow ND: Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci* 12: 652–669, 2011
- Gotti C, Moretti M, Clementi F, Riganti L, McIntosh JM, Collins AC, Marks MJ, Whiteaker P: Expression of nigrostriatal  $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors is selectively reduced, but not eliminated, by  $\beta 3$  subunit gene deletion. *Mol Pharmacol* 67: 2007–2015, 2005
- Gotti C, Moretti M, Bohr I, Ziabreva I, Vailati S, Longhi R, Riganti L, Gaimarri A, McKeith IG, Perry RH, Aarsland D, Larsen JP, Sher E, Beattie R, Clementi F, Court JA: Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. *Neurobiol Dis* 23: 481–489, 2006
- Gotti C, Moretti M, Meinerz NM, Clementi F, Gaimarri A, Collins AC, Marks MJ: Partial deletion of the nicotinic cholinergic receptor  $\alpha 4$  or  $\beta 2$  subunit genes changes the acetylcholine sensitivity of receptor-mediated 86Rb efflux in cortex and thalamus and alters relative expression of  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  subunits. *Mol Pharmacol* 73: 1796–1807, 2008
- Gotti C, Guiducci S, Tedesco V, Corbioli S, Zanetti L, Moretti M, Zanardi A, Rimondini R, Mugnaini M, Clementi F, Chiamulera C, Zoli M: Nicotinic acetylcholine receptors in the mesolimbic pathway: primary role of ventral tegmental area  $\alpha 6\beta 2^*$  receptors in mediating systemic nicotine effects on dopamine release, locomotion, and reinforcement. *J Neurosci* 30: 5311–5325, 2010
- Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC: Characterization of nicotinic receptor-mediated [ $^3$ H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem* 59: 848–856, 1992
- Grady SR, Marks MJ, Collins AC: Desensitization of nicotine-stimulated [ $^3$ H]dopamine release from mouse striatal synaptosomes. *J Neurochem* 62: 1390–1398, 1994
- Grady SR, Grun EU, Marks MJ, Collins AC: Pharmacological comparison of transient and persistent [ $^3$ H]dopamine release from mouse striatal synaptosomes and response to chronic L-nicotine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 32–43, 1997

Grady SR, Murphy KL, Cao J, Marks MJ, McIntosh JM, Collins AC: Characterization of nicotinic agonist-induced [<sup>3</sup>H]dopamine release from synaptosomes prepared from four mouse brain regions. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 651–660, 2002

Grady SR, Salminen O, McIntosh JM, Marks MJ, Collins AC: Mouse striatal dopamine nerve terminals express  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$  and two stoichiometric forms of  $\alpha 4\beta 2^*$ -nicotinic acetylcholine receptors. *J Mol Neurosci* 40: 91–95, 2010

Grady SR, Wageman CR, Patzlaff NE, Marks MJ: Low concentrations of nicotine differentially desensitize nicotinic acetylcholine receptors that include  $\alpha 5$  or  $\alpha 6$  subunits and that mediate synaptosomal neurotransmitter release. *Neuropharm* 62: 1935–1943, 2012

Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA: Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383: 713–716, 1996

Griguoli M, Cherubini E: Regulation of hippocampal inhibitory circuits by nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol* 590: 655–666, 2012

Grilli M, Zappettini S, Raiteri L, Marchi M: Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors coexist on GABAergic nerve endings in the mouse striatum and interact in modulating GABA release. *Neuropharm* 56: 610–614, 2009

Grilli M, Summa M, Salamone A, Olivero G, Zappettini S, Di Prisco S, Feligioni M, Usai C, Pittaluga A, Marchi M: In vitro exposure to nicotine induces endocytosis of presynaptic AMPA receptors modulating dopamine release in rat nucleus accumbens nerve terminals. *Neuropharm* 63: 916–926, 2012

Grinevich VP, Papke RL, Lippiello PM, Bencherif M: Atypical antipsychotics as noncompetitive inhibitors of  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 7$  neuronal nicotinic receptors. *Neuropharm* 57: 183–191, 2009

Hahn B, Shoaib M, Stolerman IP: Involvement of the prefrontal cortex but not the dorsal hippocampus in the attention-enhancing effects of nicotine in rats. *Psychophar* 168: 271–279, 2003

Han Z, Le Novère N, Zoli M, Hill JA, Champtiaux N, Changeux J: Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *Eur J Neurosci* 12: 3664–3674, 2000

Henningfield JE, Goldberg SR: Nicotine as a reinforcer in human subjects and laboratory animals. *Pharmacol Biochem Behav* 19: 989–992, 1983

Henny P, Jones BE: Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *Eur J Neurosci* 27: 654–670, 2008

- Hernandez SC, Bertolino M, Xiao Y, Pringle KE, Caruso FS, Kellar KJ: Dextromethorphan and its metabolite dextrorphan block  $\alpha 3\beta 4$  neuronal nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 962–967, 2000
- Hipólito L, Sánchez-Catalán MJ, Zanolini I, Polache A, Granero L: Shell/core differences in mu- and delta-opioid receptor modulation of dopamine efflux in nucleus accumbens. *Neuropharm* 55: 183–189, 2008
- Hirose N, Murakawa K, Takada K, Oi Y, Suzuki T, Nagase H, Cools AR, Koshikawa N: Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta<sub>1</sub>- and delta<sub>2</sub>-opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 135: 213–225, 2005
- Houdi AA, Dasgupta R, Kindy MS: Effect of nicotine use and withdrawal on brain preproenkephalin A mRNA. *Brain Res* 799: 257–263, 1998
- Imperato A, Mulas A, Di Chiara G: Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol* 132: 337–338, 1986
- Iversen LL, Iversen SD, Bloom FE, Roth RH: Catecholamines. Kirjassa: Introduction to Neuropsychopharmacology, s. 150, Oxford University Press Inc., New York 2009
- Iversen SD, Iversen LL: Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 30: 188–193, 2007
- Jarrard LE: What does the hippocampus really do? *Behav Brain Res* 71: 1–10, 1995
- Jay TM: Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol* 69: 375–390, 2003
- Jensen AA, Frølund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem* 48: 4705–4745, 2005
- Ji D, Dani JA: Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 83: 2682–2690, 2000
- Ji D, Lape R, Dani JA: Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 31: 131–141, 2001
- Johnson SW, North RA: Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12: 483–488, 1992
- Kaiser S, Wonnacott S:  $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors indirectly modulate [<sup>3</sup>H]dopamine release in rat striatal slices via glutamate release. *Mol Pharmacol* 58: 312–318, 2000

- Karczmar AG: Cholinergic cells and pathways. Kirjassa: Exploring the Vertebrate Central Cholinergic Nervous System, s. 33. Toim. Karczmar AG, Springer Science+Business Media LLC, New York, 2007
- Kassam SM, Herman PM, Goodfellow NM, Alves NC, Lambe EK: Developmental excitation of corticothalamic neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 28: 8756–8764, 2008
- Kawaguchi Y, Kondo S: Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31: 277–287, 2002
- Kawai H, Lazar R, Metherate R: Nicotinic control of axon excitability regulates thalamocortical transmission. *Nat Neurosci* 10: 1168–1175, 2007
- Kenny PJ, Cheeta S, File SE: Anxiogenic effects of nicotine in the dorsal hippocampus are mediated by 5-HT<sub>1A</sub> and not by muscarinic M<sub>1</sub> receptors. *Neuropharm* 39: 300–307, 2000a
- Kenny PJ, File SE, Neal MJ: Evidence for a complex influence of nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal serotonin release. *J Neurochem* 75: 2409–2414, 2000b
- Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C: Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66: 285–306, 2002
- Klausberger T, Somogyi P: Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321: 53–57, 2008
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux J: Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21: 1452–1463, 2001
- Konradsson-Geuken Å, Gash CR, Alexander K, Pomerleau F, Huettl P, Gerhardt GA, Bruno JP: Second-by-second analysis of alpha 7 nicotine receptor regulation of glutamate release in the prefrontal cortex of awake rats. *Synapse* 63: 1069–1082, 2009
- Koós T, Tepper JM: Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22: 529–535, 2002
- Kulak JM, Nguyen TA, Olivera BM, McIntosh JM:  $\alpha$ -Conotoxin MII blocks nicotine-stimulated dopamine release in rat striatal synaptosomes. *J Neurosci* 17: 5263–5270, 1997
- Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Choi C, Lindstrom J: Human  $\alpha 6$  AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses. *Neuropharm* 39: 2570–2590, 2000

- Lacey MG, Mercuri NB, North RA: Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9: 1233–1241, 1989
- Lambe EK, Picciotto MR, Aghajanian GK: Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacol* 28: 216–225, 2003
- Langley JN: On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol* 33: 374–413, 1905
- Laroche S, Davis S, Jay TM: Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10: 438–446, 2000
- Law P, Wong YH, Loh HH: Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 389–430, 2000
- Le Foll B, Goldberg SR: Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychophar* 178: 481–492, 2005
- Le Novère N, Zoli M, Changeux J: Neuronal nicotinic receptor  $\alpha 6$  subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci* 8: 2428–2439, 1996
- Léna C, Changeux J, Mulle C: Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci* 13: 2680–2688, 1993
- Lendvai B, Sershen H, Lajtha A, Santha E, Baranyi M, Vizi ES: Differential mechanisms involved in the effect of nicotinic agonists DMPP and lobeline to release [ $^3$ H]5-HT from rat hippocampal slices. *Neuropharm* 35: 1769–1777, 1996
- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH: Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychophar* 184: 523–539, 2006
- Levsky JM, Singer RH: Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* 116: 2833–2838, 2003
- Lewanowitsch T, Irvine RJ: Naloxone and its quaternary derivative, naloxone methiodide, have differing affinities for  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  opioid receptors in mouse brain homogenates. *Brain Res* 964: 302–305, 2003
- Lisman JE, Grace AA: The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46: 703–713, 2005
- Livingstone PD, Wonnacott S: Nicotinic acetylcholine receptors and the ascending dopamine pathways. *Biochem Pharmacol* 78: 744–755, 2009



- Livingstone PD, Srinivasan J, Kew JNC, Dawson LA, Gotti C, Moretti M, Shoaib M, Wonnacott S:  $\alpha 7$  and non- $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors modulate dopamine release in vitro and in vivo in the rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 29: 539–550, 2009
- Lu Y, Grady S, Marks MJ, Picciotto M, Changeux J, Collins AC: Pharmacological characterization of nicotinic receptor-stimulated GABA release from mouse brain synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 287: 648–657, 1998
- Lubetzki C, Chesselet MF, Glowinski J: Modulation of dopamine release in rat striatal slices by delta opiate agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 222: 435–440, 1982
- Lubin M, Erisir A, Aoki C: Ultrastructural immunolocalization of the  $\alpha 7$  nAChR subunit in guinea pig medial prefrontal cortex. *Ann NY Acad Sci* 868: 628–632, 1999
- Lukas RJ, Changeux J, Le Novère N, Albuquerque EX, Balfour DJK, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PBS, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S: International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51: 397–401, 1999
- Lukas RJ, Fryer JD, Eaton JB, Gentry CL: Some methods for studies of nicotinic acetylcholine receptor pharmacology. Kirjassa: *Nicotinic Receptors in the Nervous System*, s. 3. Toim. Levin ED, CRC Press LLC, New York, 2001
- Luo S, Kulak JM, Cartier GE, Jacobsen RB, Yoshikami D, Olivera BM, McIntosh JM:  $\alpha$ -Conotoxin AuIB selectively blocks  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J Neurosci* 18: 8571–8579, 1998
- Lynch G, Schubert P: The use of in vitro brain slices for multidisciplinary studies of synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 3: 1–22, 1980
- Löffler M, Bubl B, Huethe F, Hubbe U, McIntosh JM, Jackisch R, Feuerstein TJ: Dopamine release in human neocortical slices: characterization of inhibitory autoreceptors and of nicotinic acetylcholine receptor-evoked release. *Brain Res Bull* 68: 361–373, 2006
- Ma Z, Strecker RE, McKenna JT, Thakkar MM, McCarley RW, Tao R: Effects on serotonin of (–)nicotine and dimethylphenylpiperazinium in the dorsal raphe and nucleus accumbens of freely behaving rats. *Neuroscience* 135: 949–958, 2005
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ: Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci* 11: 308–314, 1988
- Mansvelder HD, van Aerde KI, Couey JJ, Brussaard AB: Nicotinic modulation of neuronal networks: from receptors to cognition. *Psychophar* 184: 292–305, 2006

- Mao D, Yasuda RP, Fan H, Wolfe BB, Kellar KJ: Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose ganglia. *Mol Pharmacol* 70: 1693–1699, 2006
- Marchi M, Lupinacci M, Bernero E, Bergaglia F, Raiteri M: Nicotinic receptors modulating ACh release in rat cortical synaptosomes: role of Ca<sup>2+</sup> ions in their function and desensitization. *Neurochem Int* 34: 319–328, 1999
- Marchi M, Risso F, Viola C, Cavazzani P, Raiteri M: Direct evidence that release-stimulating  $\alpha 7^*$  nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *J Neurochem* 80: 1071–1078, 2002
- Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann SF, Collins AC: Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J Neurosci* 12: 2765–2784, 1992
- Marks MJ, Bullock AE, Collins AC: Sodium channel blockers partially inhibit nicotine-stimulated <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux from mouse brain synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 833–841, 1995
- Marks MJ, Whiteaker P, Collins AC: Deletion of the  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ , or  $\beta 4$  nicotinic receptor subunit genes identifies highly expressed subtypes with relatively low affinity for [<sup>3</sup>H]epibatidine. *Mol Pharmacol* 70: 947–959, 2006
- Marks MJ, Meinerz NM, Drago J, Collins AC: Gene targeting demonstrates that  $\alpha 4$  nicotinic acetylcholine receptor subunits contribute to expression of diverse [<sup>3</sup>H]epibatidine binding sites and components of biphasic <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux with high and low sensitivity to stimulation by acetylcholine. *Neuropharm* 53: 390–405, 2007
- Marshall D, Soliakov L, Redfern P, Wonnacott S: Tetrodotoxin-sensitivity of nicotine-evoked dopamine release from rat striatum. *Neuropharm* 35: 1531–1536, 1996
- Marshall DL, Redfern PH, Wonnacott S: Presynaptic nicotinic modulation of dopamine release in the three ascending pathways studied by in vivo microdialysis: comparison of naive and chronic nicotine-treated rats. *J Neurochem* 68: 1511–1519, 1997
- Martyn JAJ, Fagerlund MJ, Eriksson L: Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia* 64 (Suppl. 1): 1–9, 2009
- Maskos U: The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system: relevance to drugs of abuse and pathology. *Br J Pharmacol* 153: S438–S445, 2008
- Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux J, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloëz-Tayarani I, Bemelmans A, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux J: Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436: 103–107, 2005

McCallum SE, Parameswaran N, Bordia T, McIntosh JM, Grady SR, Quik M: Decrease in  $\alpha 3^*/\alpha 6^*$  nicotinic receptors but not nicotine-evoked dopamine release in monkey brain after nigrostriatal damage. *Mol Pharmacol* 68: 737–746, 2005

McClure-Begley TD, King NM, Collins AC, Stitzel JA, Wehner JM, Butt CM: Acetylcholine-stimulated [<sup>3</sup>H]GABA release from mouse brain synaptosomes is modulated by  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$  nicotinic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 75: 918–926, 2009

McGehee DS, Heath MJS, Gelber S, Devay P, Role LW: Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 269: 1692–1696, 1995

Meitzen J, Luoma JI, Stern CM, Mermelstein PG:  $\beta 1$ -Adrenergic receptors activate two distinct signaling pathways in striatal neurons. *J Neurochem* 116: 984–995, 2011

Millar NS, Gotti C: Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharm* 56: 237–246, 2009

Miller EK, Cohen JD: An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24: 167–202, 2001

Mogg AJ, Whiteaker P, McIntosh JM, Marks M, Collins AC, Wonnacott S: Methyllycaconitine is a potent antagonist of  $\alpha$ -conotoxin-MII-sensitive presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 197–204, 2002

Moss J, Ungless MA, Bolam JP: Dopaminergic axons in different divisions of the adult rat striatal complex do not express vesicular glutamate transporters. *Eur J Neurosci* 33: 1205–1211, 2011

Motulsky HJ, Brown RE: Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinf* 7: 123, 2006

Mucha RF, Herz A: Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning. *Psychophar* 86: 274–280, 1985

Mucha RF, Iversen SD: Reinforcing properties of morphine and naloxone revealed by conditioned place preferences: a procedural examination. *Psychophar* 82: 241–247, 1984

Navailles S, De Deurwaerdère P: Presynaptic control of serotonin on striatal dopamine function. *Psychophar* 213: 213–242, 2011

Nisell M, Nomikos GG, Hertel P, Panagis G, Svensson TH: Condition-independent sensitization of locomotor stimulation and mesocortical dopamine release following chronic nicotine treatment in the rat. *Synapse* 22: 369–381, 1996

- Okutsu H, Watanabe S, Takahashi I, Aono Y, Saigusa T, Koshikawa N, Cools AR: Endomorphin-2 and endomorphin-1 promote the extracellular amount of accumbal dopamine via nonopioid and mu-opioid receptors, respectively. *Neuropsychopharmacol* 31: 375–383, 2006
- Parikh V, Man K, Decker MW, Sarter M: Glutamatergic contributions to nicotinic acetylcholine receptor agonist-evoked cholinergic transients in the prefrontal cortex. *J Neurosci* 28: 3769–3780, 2008
- Parikh V, Ji J, Decker MW, Sarter M: Prefrontal  $\beta$ 2 subunit-containing and  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors differentially control glutamatergic and cholinergic signaling. *J Neurosci* 30: 3518–3530, 2010
- Paul D, Standifer KM, Inturrisi CE, Pasternak GW: Pharmacological characterization of morphine-6 $\beta$ -glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 477–483, 1989
- Pentney RJW, Gratton A: Effects of local delta and mu opioid receptor activation on basal and stimulated dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rat: an in vivo electrochemical study. *Neuroscience* 45: 95–102, 1991
- Perry M, Li Q, Kennedy RT: Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. *Anal Chim Acta* 653: 1–22, 2009
- Phillips AG, LePiane FG: Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 965–968, 1980
- Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS, Brunzell DH: It is not “either/or”: activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Prog Neurobiol* 84: 329–342, 2008
- Piepponen TP, Kivastik T, Katajamäki J, Zharkovsky A, Ahtee L: Involvement of opioid  $\mu$ 1 receptors in morphine-induced conditioned place preference in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 275–279, 1997
- Piepponen TP, Honkanen A, Kivastik T, Zharkovsky A, Turtia A, Mikkola JAV, Ahtee L: Involvement of opioid  $\mu$ 1-receptors in opioid-induced acceleration of striatal and limbic dopaminergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav* 63: 245–252, 1999a
- Piepponen TP, Mikkola JAV, Ruotsalainen M, Jonker D, Ahtee L: Characterization of the decrease of extracellular striatal dopamine induced by intrastriatal morphine administration. *Br J Pharmacol* 127: 268–274, 1999b
- Pitler TA, Alger BE: Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol* 450: 127–142, 1992
- Pomerleau OF: Endogenous opioids and smoking: a review of progress and problems. *Psychoneuroendocrino* 23: 115–130, 1998

Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E: Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci* 19: 5228–5235, 1999

Puttfarcken PS, Jacobs I, R Faltynek C: Characterization of nicotinic acetylcholine receptor-mediated [<sup>3</sup>H]-dopamine release from rat cortex and striatum. *Neuropharm* 39: 2673–2680, 2000

Quarta D, Naylor CG, Barik J, Fernandes C, Wonnacott S, Stolerman IP: Drug discrimination and neurochemical studies in  $\alpha 7$  null mutant mice: tests for the role of nicotinic  $\alpha 7$  receptors in dopamine release. *Psychophar* 203: 399–410, 2009

Quick MW, Lester RAJ: Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53: 457–478, 2002

Quik M, Sum JD, Whiteaker P, McCallum SE, Marks MJ, Musachio J, McIntosh JM, Collins AC, Grady SR: Differential declines in striatal nicotinic receptor subtype function after nigrostriatal damage in mice. *Mol Pharmacol* 63: 1169–1179, 2003

Quik M, Vailati S, Bordia T, Kulak JM, Fan H, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C: Subunit composition of nicotinic receptors in monkey striatum: effect of treatments with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine or L-DOPA. *Mol Pharmacol* 67: 32–41, 2005

Radcliffe KA, Dani JA: Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 18: 7075–7083, 1998

Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R, Dani JA: Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission in hippocampal neurons. *Ann NY Acad Sci* 868: 591–610, 1999

Raiteri L, Raiteri M: Synaptosomes still viable after 25 years of superfusion. *Neurochem Res* 25: 1265–1274, 2000

Rao TS, Correa LD, Adams P, Santori EM, Sacaan AI: Pharmacological characterization of dopamine, norepinephrine and serotonin release in the rat prefrontal cortex by neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Brain Res* 990: 203–208, 2003

Rapier C, Lunt GG, Wonnacott S: Stereoselective nicotine-induced release of dopamine from striatal synaptosomes: concentration dependence and repetitive stimulation. *J Neurochem* 50: 1123–1130, 1988

Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T: Pharmacological characterization of the cloned  $\kappa$ -,  $\delta$ -, and  $\mu$ -opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45: 330–334, 1994

- Reuben M, Clarke P: Nicotine-evoked [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharm* 39: 290–299, 2000
- Rezayof A, Nazari-Serenjeh F, Zarrindast M, Sepehri H, Delphi L: Morphine-induced place preference: involvement of cholinergic receptors of the ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol* 562: 92–102, 2007
- Rice ME, Cragg SJ: Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nat Neurosci* 7: 583–584, 2004
- Ronken E, Mulder AH, Schoffelmeer ANM: Interacting presynaptic  $\kappa$ -opioid and GABA<sub>A</sub> receptors modulate dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurochem* 61: 1634–1639, 1993
- Rossi S, Singer S, Shearman E, Sershen H, Lajtha A: The effects of cholinergic and dopaminergic antagonists on nicotine-induced cerebral neurotransmitter changes. *Neurochem Res* 30: 541–558, 2005
- Rousseau SJ, Jones IW, Pullar IA, Wonnacott S: Presynaptic  $\alpha 7$  and non- $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors modulate [<sup>3</sup>H]d-aspartate release from rat frontal cortex in vitro. *Neuropharm* 49: 59–72, 2005
- Rowell PP, Winkler DL: Nicotinic stimulation of [<sup>3</sup>H]acetylcholine release from mouse cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem* 43: 1593–1598, 1984
- Rowell PP, Carr LA, Garner AC: Stimulation of [<sup>3</sup>H]dopamine release by nicotine in rat nucleus accumbens. *J Neurochem* 49: 1449–1454, 1987
- Sacaan AI, Dunlop JL, Lloyd GK: Pharmacological characterization of neuronal acetylcholine gated ion channel receptor-mediated hippocampal norepinephrine and striatal dopamine release from rat brain slices. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 224–230, 1995
- Sakurada T, Takada S, Eguchi H, Izumi K, Satoh N, Ueda S: Relationship between plasma concentrations of morphine and its metabolites and pain in cancer patients. *Pharm World Sci* 32: 737–743, 2010
- Sakurai Y, Takano Y, Kohjimoto Y, Honda K, Kamiya H: Enhancement of [<sup>3</sup>H]dopamine release and its [<sup>3</sup>H] metabolites in rat striatum by nicotinic drugs. *Brain Res* 242: 99–106, 1982
- Salminen O, Murphy KL, McIntosh JM, Drago J, Marks MJ, Collins AC, Grady SR: Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. *Mol Pharmacol* 65: 1526–1535, 2004

- Salminen O, Whiteaker P, Grady SR, Collins AC, McIntosh JM, Marks MJ: The subunit composition and pharmacology of  $\alpha$ -Conotoxin MII-binding nicotinic acetylcholine receptors studied by a novel membrane-binding assay. *Neuropharm* 48: 696–705, 2005
- Salminen O, Drapeau JA, McIntosh JM, Collins AC, Marks MJ, Grady SR: Pharmacology of  $\alpha$ -conotoxin MII-sensitive subtypes of nicotinic acetylcholine receptors isolated by breeding of null mutant mice. *Mol Pharmacol* 71: 1563–1571, 2007
- Scarr E: Muscarinic receptors: their roles in disorders of the central nervous system and potential as therapeutic targets. *CNS Neurosci Ther* 18: 369–379, 2012
- Schlösser B, Kudernatsch MB, Sutor B, Ten Bruggencate G:  $\delta$ ,  $\mu$ , and  $\kappa$  opioid receptor agonists inhibit dopamine overflow in rat neostriatal slices. *Neurosci Lett* 191: 126–130, 1995
- Schmidt BL, Tambeli CH, Gear RW, Levine JD: Nicotine withdrawal hyperalgesia and opioid-mediated analgesia depend on nicotine receptors in nucleus accumbens. *Neuroscience* 106: 129–136, 2001
- Schneider NG, Olmstead RE, Franzon MA, Lunell E: The nicotine inhaler. *Clin Pharmacokinet* 40: 661–684, 2001
- Scholze P, Orr-Urtreger A, Changeux J, McIntosh J, Huck S: Catecholamine outflow from mouse and rat brain slice preparations evoked by nicotinic acetylcholine receptor activation and electrical field stimulation. *Br J Pharmacol* 151: 414–422, 2007
- Schwartz RD, Lehmann J, Kellar KJ: Presynaptic nicotinic cholinergic receptors labeled by [ $^3$ H]acetylcholine on catecholamine and serotonin axons in brain. *J Neurochem* 42: 1495–1498, 1984
- Seamans JK, Lapish CC, Durstewitz D: Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotox Res* 14: 249–262, 2008
- Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW: Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13: 596–604, 1993
- Sershen H, Balla A, Lajtha A, Vizi ES: Characterization of nicotinic receptors involved in the release of noradrenaline from the hippocampus. *Neuroscience* 77: 121–130, 1997
- Sharma G, Grybko M, Vijayaraghavan S: Action potential-independent and nicotinic receptor-mediated concerted release of multiple quanta at hippocampal CA3-mossy fiber synapses. *J Neurosci* 28: 2563–2575, 2008

Sharples CGV, Kaiser S, Soliakov L, Marks MJ, Collins AC, Washburn M, Wright E, Spencer JA, Gallagher T, Whiteaker P, Wonnacott S: UB-165: a novel nicotinic agonist with subtype selectivity implicates the  $\alpha 4\beta 2^*$  subtype in the modulation of dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurosci* 20: 2783–2791, 2000

Shippenberg TS, Bals-Kubik R, Herz A: Examination of the neurochemical substrates mediating the motivational effects of opioids: role of the mesolimbic dopamine system and D-1 vs. D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 53–59, 1993

Shippenberg TS, Heidbreder C, Lefevour A: Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics. *Eur J Pharmacol* 299: 33–39, 1996

Smith A, Bolam J: The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13: 259–265, 1990

Soliakov L, Gallagher T, Wonnacott S: Anatoxin-a-evoked [ $^3\text{H}$ ]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharm* 34: 1535–1541, 1995

Son J, Winzer-Serhan UH: Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in rat hippocampal GABAergic interneurons. *J Comp Neurol* 511: 286–299, 2008

Sotomayor R, Forray MI, Gysling K: Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J Neurosci Res* 81: 132–139, 2005

Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS: The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 55: 1734–1740, 1990

Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS: Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2046–2050, 1992

Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A: Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J Neurosci* 30: 8229–8233, 2010

Svingos AL, Clarke CL, Pickel VM: Localization of the  $\delta$ -opioid receptor and dopamine transporter in the nucleus accumbens shell: Implications for opiate and psychostimulant cross-sensitization. *Synapse* 34: 1–10, 1999

Svingos AL, Chavkin C, Colago EEO, Pickel VM: Major coexpression of  $\kappa$ -opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles. *Synapse* 42: 185–192, 2001a



- Svingos AL, Colago EEO, Pickel VM: Vesicular acetylcholine transporter in the rat nucleus accumbens shell: Subcellular distribution and association with  $\mu$ -opioid receptors. *Synapse* 40: 184–192, 2001b
- Talka R, Salminen O, Whiteaker P, Lukas RJ, Tuominen RK: Nicotine–morphine interactions at  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 7$  and  $\alpha 3^*$  nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* 701: 57–64, 2013
- Taly A, Corringier P, Guedin D, Lestage P, Changeux J: Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8: 733–750, 2009
- Tanda G, Di Chiara G: A dopamine– $\mu 1$  opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (Fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse. *Eur J Neurosci* 10: 1179–1187, 1998
- Tang J, Dani JA: Dopamine enables in vivo synaptic plasticity associated with the addictive drug nicotine. *Neuron* 63: 673–682, 2009
- Tani Y, Saito K, Imoto M, Ohno T: Pharmacological characterization of nicotinic receptor-mediated acetylcholine release in rat brain—an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 351: 181–188, 1998
- Tecuapetla F, Patel JC, Xenias H, English D, Tadros I, Shah F, Berlin J, Deisseroth K, Rice ME, Tepper JM, Koos T: Glutamatergic signaling by mesolimbic dopamine neurons in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 30: 7105–7110, 2010
- Tejeda HA, Natividad LA, Orfila JE, Torres OV, O'Dell LE: Dysregulation of kappa-opioid receptor systems by chronic nicotine modulate the nicotine withdrawal syndrome in an age-dependent manner. *Psychophar* 224: 289–301, 2012
- Threlfell S, Clements MA, Khodai T, Pienaar IS, Exley R, Wess J, Cragg SJ: Striatal muscarinic receptors promote activity dependence of dopamine transmission via distinct receptor subtypes on cholinergic interneurons in ventral versus dorsal striatum. *J Neurosci* 30: 3398–3408, 2010
- Tomé AR, Izaguirre V, Rosario LM, Cena V, Gonzalez-Garcia C: Naloxone inhibits nicotine-induced receptor current and catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. *Brain Res* 903: 62–65, 2001
- Toth E, Sershen H, Hashim A, Vizi ES, Lajtha A: Effect of nicotine on extracellular levels of neurotransmitters assessed by microdialysis in various brain regions: role of glutamic acid. *Neurochem Res* 17: 265–271, 1992
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H: Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11: S133–S153, 2008

- Trovero F, Herve D, Desban M, Glowinski J, Tassin J: Striatal opiate mu-receptors are not located on dopamine nerve endings in the rat. *Neuroscience* 39: 313–321, 1990
- Tucci SA, Genn RF, File SE: Methyllycaconitine (MLA) blocks the nicotine evoked anxiogenic effect and 5-HT release in the dorsal hippocampus: possible role of  $\alpha 7$  receptors. *Neuropharm* 44: 367–373, 2003
- Turner TJ: Nicotine enhancement of dopamine release by a calcium-dependent increase in the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J Neurosci* 24: 11328–11336, 2004
- Unwin N: Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346: 967–989, 2005
- Uylings H, Groenewegen HJ, Kolb B: Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146: 3–17, 2003
- Van Ree JM, Slangen JL, De Wied D: Intravenous self-administration of drugs in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 204: 547–557, 1978
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44: 619, 2008
- Vidal C, Changeux J: Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience* 56: 23–32, 1993
- Vihavainen T, Mijatovic J, Piepponen TP, Tuominen RK, Ahtee L: Effect of morphine on locomotor activity and striatal monoamine metabolism in nicotine-withdrawn mice. *Behav Brain Res* 173: 85–93, 2006
- Vihavainen T, Piltonen M, Tuominen RK, Korpi ER, Ahtee L: Morphine-nicotine interaction in conditioned place preference in mice after chronic nicotine exposure. *Eur J Pharmacol* 587: 169–174, 2008a
- Vihavainen T, Relander TRA, Leiviskä R, Airavaara M, Tuominen RK, Ahtee L, Piepponen TP: Chronic nicotine modifies the effects of morphine on extracellular striatal dopamine and ventral tegmental GABA. *J Neurochem* 107: 844–854, 2008b
- Voorn P, Vanderschuren LJMJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CMA: Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci* 27: 468–474, 2004
- Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW: Distribution of  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , and  $\beta 2$  neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284: 314–335, 1989

- Walters CL, Brown S, Changeux J, Martin B, Damaj MI: The  $\beta 2$  but not  $\alpha 7$  subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. *Psychophar* 184: 339–344, 2006
- Wang JKT: Presynaptic glutamate receptors modulate dopamine release from striatal synaptosomes. *J Neurochem* 57: 819–822, 1991
- Wang S, Morris RGM: Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol* 61: 49–79, 2010
- Wessler I, Kirkpatrick C: Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 154: 1558–1571, 2008
- Wessler I, Kirkpatrick C, Racke K: The cholinergic ‘pitfall’: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198–205, 1999
- Westfall T: Effect of nicotine and other drugs on the release of  $^3\text{H}$ -norepinephrine and  $^3\text{H}$ -dopamine from rat brain slices. *Neuropharm* 13: 693–700, 1974
- Westfall TC, Grant H, Naes L, Meldrum M: The effect of opioid drugs on the release of dopamine and 5-hydroxytryptamine from rat striatum following activation of nicotinic-cholinergic receptors. *Eur J Pharmacol* 92: 35–42, 1983
- Whiteaker P, Garcha HS, Wonnacott S, Stolerman IP: Locomotor activation and dopamine release produced by nicotine and isoarecolone in rats. *Br J Pharmacol* 116: 2097–2105, 1995
- Whiteaker P, Marks MJ, Grady SR, Lu Y, Picciotto MR, Changeux J, Collins AC: Pharmacological and null mutation approaches reveal nicotinic receptor diversity. *Eur J Pharmacol* 393: 123–135, 2000
- Whiteaker P, Peterson CG, Xu W, McIntosh JM, Paylor R, Beaudet AL, Collins AC, Marks MJ: Involvement of the  $\alpha 3$  subunit in central nicotinic binding populations. *J Neurosci* 22: 2522–2529, 2002
- Whittaker VP, Michaelson IA, Kirkland RJA: The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem J* 90: 293–303, 1964
- Wilcox JN: Fundamental principles of in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 41: 1725–1733, 1993
- Wilkie GI, Hutson P, Sullivan JP, Wonnacott S: Pharmacological characterization of a nicotinic autoreceptor in rat hippocampal synaptosomes. *Neurochem Res* 21: 1141–1148, 1996
- Winek CL, Wahba WW, Winek Jr CL, Balzer TW: Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Sci Int* 122: 107–123, 2001

- Wonnacott S: Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20: 92–98, 1997
- Wonnacott S: Gates and filters: unveiling the physiological roles of nicotinic acetylcholine receptors in dopaminergic transmission. *Br J Pharmacol* 153: S2–S4, 2008
- Wonnacott S, Irons J, Rapier C, Thorne B, Lunt GG: Presynaptic modulation of transmitter release by nicotinic receptors. *Prog Brain Res* 79: 157–163, 1989
- Wonnacott S, Kaiser S, Mogg A, Soliakov L, Jones IW: Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 393: 51–58, 2000
- Woo R, Park E, Shin M, Jeong M, Zhao R, Shin B, Kim C, Park J, Kim K: Mechanism of nicotine-evoked release of [<sup>3</sup>H]-noradrenaline in human cerebral cortex slices. *Br J Pharmacol* 137: 1063–1070, 2002
- Wu Y, Pearl SM, Zigmond MJ, Michael AC: Inhibitory glutamatergic regulation of evoked dopamine release in striatum. *Neuroscience* 96: 65–72, 2000
- Yamaguchi T, Wang H, Li X, Ng TH, Morales M: Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J Neurosci* 31: 8476–8490, 2011
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI: Cloning and functional comparison of  $\kappa$  and  $\delta$  opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6736–6740, 1993
- Yoshida Y, Koide S, Hirose N, Takada K, Tomiyama K, Koshikawa N, Cools AR: Fentanyl increases dopamine release in rat nucleus accumbens: involvement of mesolimbic mu- and delta-2-opioid receptors. *Neuroscience* 92: 1357–1365, 1999
- Yu ZJ, Wecker L: Chronic nicotine administration differentially affects neurotransmitter release from rat striatal slices. *J Neurochem* 63: 186–194, 1994
- Zappettini S, Grilli M, Salamone A, Fedele E, Marchi M: Pre-synaptic nicotinic receptors evoke endogenous glutamate and aspartate release from hippocampal synaptosomes by way of distinct coupling mechanisms. *Br J Pharmacol* 161: 1161–1171, 2010
- Zappettini S, Grilli M, Lagomarsino F, Cavallero A, Fedele E, Marchi M: Presynaptic nicotinic  $\alpha 7$  and non- $\alpha 7$  receptors stimulate endogenous GABA release from rat hippocampal synaptosomes through two mechanisms of action. *PLoS ONE* 6: e16911, 2011
- Zarrindast M, Pazouki M, Nassiri-Rad S: Involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in nicotine-induced antinociception. *Pharmacol Toxicol* 81: 209–213, 1997
- Zarrindast M, Khoshayand M, Shafaghi B: The development of cross-tolerance between morphine and nicotine in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 9: 227–233, 1999

Zarrindast M, Faraji N, Rostami P, Sahraei H, Ghoshouni H: Cross-tolerance between morphine-and nicotine-induced conditioned place preference in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 74: 363–369, 2003

Zhang H, Sulzer D: Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine. *Nat Neurosci* 7: 581–582, 2004

Zhang H, Sulzer D: Regulation of striatal dopamine release by presynaptic auto-and heteroreceptors. *Basal ganglia* 2: 5–13, 2012

Zhang T, Zhang L, Liang Y, Siapas AG, Zhou F, Dani JA: Dopamine signaling differences in the nucleus accumbens and dorsal striatum exploited by nicotine. *J Neurosci* 29: 4035–4043, 2009

Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J: Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22: 1709–1717, 2002

Zhou F, Liang Y, Dani JA: Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci* 4: 1224–1229, 2001

Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C: Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci* 22: 8785–8789, 2002