

FRISÄTTNING AV NEUROTRANSMITTORER FÖRMEDLAD VIA  
NIKOTINRECEPTORER

Anna Hedström  
Helsingfors universitet  
Farmaceutiska fakulteten  
Avdelningen för farmakologi och  
farmakoterapi  
November 2020

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty <b>Farmaceutiska fakulteten</b>		Osasto/Sektion– Department <b>Avdelningen för farmakologi och farmakoterapi</b>	
Tekijä/Författare – Author <b>Anna Hedström</b>			
Työn nimi / Arbetets titel – Title <b>Frisättning av neurotransmittorer förmedlad via nikotinreceptorer</b>			
Oppiaine /Läroämne – Subject <b>Farmakologi</b>			
Työn laji/Arbetets art – Level <b>Pro-gradu avhandling</b>		Aika/Datum – Month and year <b>November 2020</b>	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages <b>35</b>
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Nikotinreceptorernas förmåga att reglera frisättning av noradrenalin, dopamin och GABA hör till deras viktigaste funktioner i det centrala nervsystemet. Frisättning av neurotransmittorer till följd av stimulering av nikotinreceptorer behandlas i denna avhandling. Detta har kunnat undersökas med flera olika metoder, bl.a. hjärnskivor, mikrodialys och synaptosomer. Forskning med synaptosomer har bidragit med värdefull information om nikotinreceptorernas funktion och deras förmåga att förmedla frisättning av olika neurotransmittorer. Dessutom har forskning med nikotinreceptor-antagonister gett information om nikotinreceptorernas stökiometri i olika hjärnområden.</p> <p>I avhandlingen undersöktes nikotinreceptorernas förmåga att reglera dopaminfrisättning från striatala synaptosomer som erhållits från möss. Acetylkolin och vareniklin stimulerade frisättning av [<sup>3</sup>H]dopamin från de striatala synaptosomerna. Genom att använda den receptorspecifika antagonisten <math>\alpha</math>-conotoxin-MII, undersöktes <math>\alpha</math>-conotoxin-MII-resistent och -känslig frisättning av [<sup>3</sup>H]dopamin från de striatala synaptosomerna. [<sup>3</sup>H]Dopaminfrisättningen förmedlades i huvudsak via <math>\alpha 6\beta 2^*</math>- och <math>\alpha 4\beta 2^*</math>-receptorerna. Andra nikotinreceptorers roll kunde dock inte helt uteslutas, men baserat på resultat från tidigare forskning antas deras roll i detta vara liten.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Nikotinreceptorer, noradrenalin, centrala nervsystemet, synaptosomer, locus coeruleus, hippocampus, hjärnbarken, striatum, amygdala, hypotalamus</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>Farmaceutiska fakulteten, Avdelningen för farmakologi och farmakoterapi</b>			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information <b>Handledare: Outi Salminen, universitetslektor, FaT, Dos.</b>			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty <b>Faculty of Pharmacy</b>		Osasto/Sektion– Department <b>Division of Pharmacology and Pharmacotherapy</b>	
Tekijä/Författare – Author <b>Anna Hedström</b>			
Työn nimi / Arbetets titel – Title <b>Nicotinic acetylcholine receptors as mediators of neurotransmitter release</b>			
Oppiaine /Läroämne – Subject <b>Pharmacology</b>			
Työn laji/Arbetets art – Level <b>Master’s thesis</b>		Aika/Datum – Month and year <b>November 2020</b>	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages <b>35</b>
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>The ability to regulate release of noradrenaline, dopamine and GABA is one of the most important roles of the nicotinic receptors. The release of neurotransmitters following stimulation of nicotinic receptors is addressed in the thesis, with focus on dopamine and noradrenaline. Release of neurotransmitters, mediated through nicotinic receptors, has been researched using various methods, including brain slices, microdialysis and synaptosomes. Research using synaptosomes have provided valuable information regarding nicotinic receptors and their ability to regulate neurotransmitter release. Research using receptor specific antagonists have provided information regarding the stoichiometry of nicotinic receptor in different regions of the brain.</p> <p>The primary focus in the thesis, was the characterization of [<sup>3</sup>H]dopamine release following stimulation of nicotinic receptors with varenicline and acetylcholine, using synaptosomes from mouse striatum. Using <math>\alpha</math>-conotoxin-MII, the [<sup>3</sup>H]dopamine release was divided into <math>\alpha</math>-conotoxin-MII-resistant and -sensitive release. [<sup>3</sup>H]Dopamine release was mediated through <math>\alpha 6\beta 2^*</math>- and <math>\alpha 4\beta 2^*</math>-receptors from striatal synaptosomes. The involvement of other receptors could not be ruled out, but based on these results and results from previous studies, the involvement of other nicotinic receptors is supposedly low.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Nicotinic receptor, noradrenaline, central nervous system, synaptosomes, locus coeruleus, hippocampus, cortex, striatum, amygdala, hypothalamus</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>Faculty of Pharmacy, Division of Pharmacology and Pharmacotherapy</b>			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information <b>Supervisor: Outi Salminen, university lecturer, Pharm D., Doc.</b>			

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1.	INLEDNING .....	1
1.1.	Noradrenalinfrisättning i centrala nervsystemet reglerad av nikotinreceptorer .....	2
1.1.1.	Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i locus coeruleus .....	2
1.1.2.	Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i hippocampus.....	3
1.1.3.	Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i hjärnbarken.....	6
1.1.4.	Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i amygdala .....	13
1.1.5.	Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i hypotalamus .....	13
2.	MATERIAL OCH METODER .....	14
2.1.	Frisättning av neurotransmittorer från synaptosomer .....	14
2.1.1.	Dopaminfrisättning från synaptosomer .....	15
2.1.2.	GABA-frisättning från synaptosomer .....	16
2.2.	Material .....	17
2.3.	Försöksdjur.....	18
2.4.	Forskningsmetod .....	18
2.4.1.	Synaptosomperfusionsapparaturens funktion .....	18
2.4.2.	Förberedning av synaptosomer från striatum.....	19
2.4.3.	Upptag av radioaktivt dopamin i synaptosomer.....	20
2.4.4.	Frisättning av radioaktivt dopamin från synaptosomer.....	20
2.4.5.	Analys av resultaten .....	21
3.	RESULTAT .....	22
3.1.	Dopaminfrisättning till följd av stimulering av nikotinreceptorer med agonister....	22
4.	DISKUSSION OCH SLUTSATSER.....	25
5.	KÄLLOR.....	31

## 1. INLEDNING

I denna avhandling undersöktes dopaminfrisättning från striatala synaptosomer till följd av stimulering av nikotinreceptorer. Även tidigare undersökningar som undersökt noradrenalinfrisättning i centrala nervsystemet med synaptosomer och andra metoder granskades. Synaptosomer som forskningsmetod granskades också, med fokus på forskning som undersökt frisättning av neurotransmittorer i centrala nervsystemet.

Denna avhandling består av kortare litteraturgranskning av forskning med olika metoder som fokuserat på noradrenalinfrisättning till följd av stimulering av nikotinreceptorer. Forskning som undersökt vilka nikotinreceptorunderenheter som förmedlar noradrenalinfrisättning i olika regioner i hjärnan behandlas också. Ytterligare behandlas även forskning som undersökt neurotransmittorfrisättning i centrala nervsystemet med synaptosomer. Forskning med synaptosomer och deras potential för att undersöka neurotransmittersystem tas också upp också här.

I denna avhandling undersöktes också dopaminfrisättning från striatala synaptosomer. Dopaminfrisättningen till följd av nikotinreceptorstimulering med vareniklin och acetylkolin undersöktes. Genom att utnyttja  $\alpha$ -conotoxin-MII, delades dopaminfrisättningen upp i  $\alpha$ -conotoxin-MII-känslig och -resistent frisättning. Målet med denna avhandling var att undersöka dopaminfrisättning till följd av stimulering av presynaptiska nikotinreceptorer med agonister. Metoderna, resultaten och tolkning av resultaten presenteras även här och till sist presenteras även slutsatser baserat på resultaten.

På grund av den rådande situationen med coronapandemin, kunde undersökningarna med synaptosomer inte fortsättas. Den ursprungliga planen var att fortsätta undersöka dopaminfrisättningen från striatala synaptosomerna efter stimulering med andra farmakologiska substanser och sedan fortsätta med att undersöka noradrenalinfrisättningen från synaptosomer från prefrontala cortex eller den motoriska barken, men dessa planer avbröts p.g.a. förändrade omständigheter till följd av pandemin.

### 1.1. Noradrenalinfrisättning i centrala nervsystemet reglerad av nikotinreceptorer

En av de viktigaste uppgifterna för nikotinreceptorer i centrala nervsystemet (CNS) är deras förmåga att reglera frisättning av olika neurotransmittorer (Picciotto m.fl. 2001; Dani 2015). Denna förmåga att reglera frisättning av neurotransmittorer i CNS har varit föremål för forskning under en längre tid. Nikotinreceptorerna interagerar med flera olika neurotransmittersystem i hjärnan och de presynaptiska receptorerna reglerar frisättning av bl.a. dopamin, noradrenalin, GABA och serotonin (Albuquerque m.fl. 1995).

De presynaptiska nikotinreceptorernas roll i det dopaminerga systemet i CNS har blivit undersökt i större utsträckning än deras roll i det noradrenerga systemet (Azam och McIntosh 2006). Deras förmåga att reglera frisättning av olika signalsubstanser har kunnat kartläggas med flera olika forskningsmetoder, bl.a. med synaptosomer och mikrodialys (Chefer m.fl. 2009; Evans 2015). Båda metoderna har bidragit med nya och viktiga upptäckter om de olika neurotransmittersystemen och deras receptorer. Metoderna lämpar sig för att studera de olika neurotransmittorer, deras frisättning och interaktioner mellan de olika neurotransmittersystemen (Singewald och Philippu 1998). Dessutom har forskning med hjärnskivor från gnagare varit en av de metoderna som använts för att kartlägga nikotinreceptorernas roll i det noradrenerga systemet (Leslie m.fl. 2002).

#### 1.1.1. Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i locus coeruleus

Nikotinreceptorerna och deras roll i förmedling av noradrenalinfrisättning i locus coeruleus (LC) har undersökts *in vitro* av bl.a. Gallardo och Leslie (1998). Noradrenalinfrisättning efter stimulering med nikotin undersöktes med LC-celldlingar som isolerats från råttfoster. Målet med forskningen var att undersöka effekten av rökning (nikotin) under graviditeten på fostrets utveckling. Rökning under graviditeten associeras bl.a. med ökad risk för inlärningssvårigheter och störningar i de kognitiva funktionerna hos barn (Fergusson m.fl. 1993).

Nikotin stimulerade  $Ca^{2+}$ -beroende frisättning av noradrenalin i LC-neuroner (Gallardo och Leslie 1998). Även andra nikotinreceptor-agonister undersöktes – bl.a. epibatidin, vilket också stimulerade frisättning av noradrenalin från LC-neuroner. Detta ansågs vara receptorberoende, eftersom agonisterna som användes främjade frisättning av noradrenalin, medan antagonisterna blockerade frisättningen. Noradrenalinfrisättningen antogs förmedlas av  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorerna, eftersom de hittats i LC, även hos råttfoster (Naeff m.fl. 1992; Gallardo och Leslie 1998). Man kunde dock inte utesluta att andra underenheter var involverad i den nikotinreceptormedierade

noradrenalinfrisättningen, eftersom man även hittat andra underenheter i LC hos råttfoster. Forskningen visade att nikotin stimulerar frisättning av noradrenalin i LC redan under fosterstadiet. Resultaten visade också att det noradrenerga systemet har en viktig roll i utvecklingen av CNS.

Egan och North (1986) utförde forskning som fokuserade på effekterna av nikotin på LC-neuroner. Noradrenalinfrisättningen efter stimulering med nikotin undersöktes *in vitro* med LC-neuroner från råttor. Resultaten visade att nikotin depolariserar LC-neuroner. Perfusion med nikotin ledde till depolarisering av cellmembranet. Desensitisering av nikotinreceptorer till följd av nikotinadministrering kunde också observeras. Desensitisering av nikotinreceptorer är ett fenomen förekommer under långvarig eller upprepad exponering med nikotinagonister (Egan och North 1986; Ochoa m.fl. 1989). Detta leder till tillfällig inaktivering av nikotinreceptorernas jonkanaler och detta fenomen har också varit föremål för forskning i hopp om att förstå fenomenets komplexa fysiologiska roll.

Trots att det finns forskning som undersökt nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i LC, har forskning i högre grad fokuserat på LC-neuronernas förmåga att påverka frisättningen av noradrenalin i andra hjärnområden via de noradrenerga nervterminalerna. (Egan och North 1986; Mitchell 1993; Gallardo och Leslie 1998).

#### 1.1.2. Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i hippocampus

Frisättning av noradrenalin i områden som innerveras av noradrenerga neuroner från LC, förmedlas även via nikotinreceptorer (Mitchell 1993). Frisättning av noradrenalin i hippocampus påverkas av nikotin som administreras till LC. Noradrenalinfrisättningen från hippocampus mättes *in vivo* m.h.a. mikrodialys. Mitchell (1993) konstaterade att systemisk administrering av nikotin ledde till ökad noradrenalinfrisättning i hippocampus hos råttor, vilket visar att noradrenalinfrisättning i hippocampus kan förmedlas via nikotinreceptorer i området.

Nikotinreceptorernas inverkan på det noradrenerga systemet i hippocampus har undersökts av bl.a. Azam och McIntosh (2006), där man undersökte noradrenalinfrisättningen i hippocampus hos möss med synaptosomer. Genom att blockera specifika nikotinreceptor-underenheter med conotoxiner specifika för utvalda underenheter, kunde man också urskilja vilka nikotinreceptorunderenheter som var ansvariga för frisättningen av noradrenalin i hippocampus.

Både  $\beta 2$ - och  $\beta 4$ -underenheterna var ansvariga för noradrenalinfrisättningen i hippocampus (Azam och McIntosh 2006). Genom att använda  $\beta 2$ -KO-möss och även  $\beta 4$ -KO-möss kunde man också fastställa att  $\beta 2$ -underenheten har en viktigare roll än  $\beta 4$  angående nikotinstimulerad noradrenalinfrisättning från hippocampala synaptosomer från möss. Resultaten visade att i stort sätt alla nikotinreceptorer som förmedlar noradrenalinfrisättning i hippocampus har en  $\beta 2$ -underenhet. En stor del av dessa receptorer var associerade med  $\alpha 4$ - och  $\beta 3$ -underenheter. I  $\beta 4$ -KO-möss verkar  $\beta 2$ -underenheten kompensera för frånvaron av  $\beta 4$ -underenheten. När  $\beta 2$ -underenheten blockerades frisattes nästa inget noradrenalin alls från de noradrenerga nervterminalerna, medan blockering av  $\beta 4$ -underenheten i hippocampus inte ledde till signifikant reduktion av noradrenalinfrisättning (totala mängden).

Resultaten från samma forskning visade också att största delen av nikotinreceptorerna som förmedlade noradrenalinfrisättning också hade en  $\alpha 6$ -underenhet (Azam och McIntosh 2006). När man blockerade  $\alpha 4$ -underenheten kunde man också observera att noradrenalinfrisättningen minskade signifikant, vilket indikerar att  $\alpha 4$ -underenheten också, likt  $\beta 2$ -underenheten, har en väldigt viktig roll för frisättning av noradrenalin från hippocampus. Försök med KO-möss som saknade  $\alpha 4$ -underenheten visade att noradrenalinfrisättningen minskade, men försvann inte helt. Den mängd noradrenalin som frisattes antogs bero på  $\alpha 6\beta 2\beta 4(\beta 3)$  -receptorer som fortfarande fungerar i  $\alpha 4$ -KO-möss. Eliminering av  $\beta 3$ -underenheten ledde till nästan total eliminering av noradrenalinfrisättning, vilket indikerar att  $\beta 3$ -underenheten med stor sannolikhet finns i de flesta nikotinreceptorerna i hippocampala noradrenerga nervterminaler.

Luo m.fl. 1998 undersökte effekten av den  $\alpha 3\beta 4$ -specifika antagonisten  $\alpha$ -Conotoxin AuIB ( $\alpha$ -CTX-AuIB) på noradrenalinfrisättning med hippocampala synaptosomer. Resultaten visade att  $\alpha$ -CTX-AuIB blockerade noradrenalinfrisättning i hippocampala synaptosomer från råttor. Ungefär 20-30 % av noradrenalinfrisättningen blockerades, vilket indikerar närvaro av  $\alpha 3\beta 4^*$ -receptorer i hippocampus hos råttor. Detta stämmer överens med forskningen utförd av Azam och McIntosh (2006), som visade att både  $\alpha 3$ - och  $\beta 4$ -underenheterna finns i hippocampala regioner.

Azam m.fl. (2010) utförde undersökningar med hippocampala synaptosomer från möss och utnyttjade ett nytt conotoxin:  $\alpha$ -Conotoxin BuIA[T5A;P6O] ( $\alpha$ -CTX BuIA[T5A;P6O]). Resultaten visade att ungefär en tredjedel av noradrenalinfrisättningen regleras via  $\alpha 6\beta 4^*$ -



receptorerna och att den resterande frisättningen av noradrenalin regleras via  $\alpha_6^*$ -receptorer, som inte associeras med  $\beta_4$ -underenheten. Antagligen regleras den resterande noradrenalinfrisättningen via  $\alpha_6\beta_2^*$ -receptorer (Azam och McIntosh 2006; Azam m.fl. 2010). Dessa slutsatser kunde dras, eftersom man i samma studie konstaterat att noradrenalinfrisättningen i hippocampala synaptosomer från  $\alpha_6$ -KO-möss är obefintlig efter stimulering av synaptosomerna med nikotin. I tidigare forskning har man även kunnat observera att  $\alpha_4$ -,  $\beta_2$ -, och  $\beta_3$ -underenheterna har en viktig roll i regleringen av noradrenalinfrisättningen i hippocampus (Azam och McIntosh 2006; Scholze m.fl. 2007)

I undersökningen utförd av Azam och McIntosh (2006) kunde man även observera att noradrenalinfrisättning hos 2-3 veckor gamla möss var högre än hos vuxna möss. Detta beror antagligen på att noradrenalinets roll som neurotrofisk faktor i icke-mogna CNS. Noradrenalin reglerar proliferation av celler, celldifferentiering och synaptogenes i CNS-utvecklingen. O'Leary och Leslie (2003) kunde observera liknande effekter i lillhjärnan hos råttor i sin egen forskning. Detta antogs vara en av de viktigaste faktorerna associerade med utveckling av olika funktioner som äger rum under perioden då en ökad noradrenalinfrisättning observerades. Det är även möjligt att samma orsak ligger bakom en ökad noradrenalinfrisättning i mössens hippocampus under de första veckorna efter födseln (Azam och McIntosh 2006).

Leslie m.fl. (2002) har också jämfört nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i färdigutvecklade hippocampus med noradrenalinfrisättningen i hippocampus som inte ännu är fullt utvecklad. Undersökningen gjordes m.h.a. hjärnskivor och synaptosomer som erhållits från råttornas hippocampus. Stimulering med nikotin ledde till noradrenalinfrisättning med båda metoderna och både hos vuxna och nyfödda (1 vecka gamla) råttor. Frisättningen var koncentrationsberoende. Forskningen visade att nikotinreceptorer förmedlar noradrenalinfrisättning till följd av stimulering med nikotin under födseln och även under postnatal utveckling, vilket tyder på att det noradrenerga- och kolinerga systemet har viktiga uppgifter i reglering av hippocampala funktioner i alla utvecklingsstadier. I båda fallen inhiberade också nikotinantagonister noradrenalinfrisättningen i hippocampus.

Den maximala koncentrationen av noradrenalin som frisattes till följd av stimulering med nikotin var högre i de hippocampala skivorna än i de hippocampala synaptosomerna (Leslie m.fl. 2002). Detta kan bero på indirekt stimulering av nikotinreceptorer som kan förekomma vid undersökningar som involverar skivor från olika hjärnområden (Clarke och Reuben 1996).

Detta kan förklaras med att den indirekta stimuleringen möjligen kräver närvaro av axoner. Mindre frisättning av noradrenalin från synaptosomer jämfört med frisättning i hjärnskivor från olika områden har också observerats i andra undersökningar (Sacaan m.fl. 1995; Clarke och Reuben 1996; Leslie m.fl. 2002). Noradrenalinfrisättning i hippocampala synaptosomer påverkas inte av tetrodotoxin som är en  $\text{Na}^{2+}$ -jonkanalantagonist, som även blockerar nikotinreceptorer. Tetrodotoxin blockerar däremot noradrenalinfrisättning i hippocampala hjärnskivor, vilket också ger stöd för teorier angående indirekta mekanismer bakom noradrenalinfrisättning kopplade till närvaro av axoner.

Leslie m.fl. (2002) konstaterade också att frisättningen av noradrenalin i hippocampus var resultat av både direkt och indirekt stimulering av nikotinreceptorer. Resultaten visade också att noradrenalinfrisättningen stimulerades av GABA-frisättning. Tidigare undersökningar har också visat att GABA-A-receptorer har excitatoriska effekter på noradrenerga nervterminaler i hippocampus (Fung och Fillenz 1984). Mekanismerna bakom den excitatoriska effekten av GABA-A på noradrenerga nervterminaler är inte helt klarlagd (Leslie m.fl. 2002). Den indirekta excitatoriska effekten av nikotin kunde observeras både i färdigutvecklade och neonatala hippocampus i råttor.

Noradrenalinfrisättning i hippocampus har undersökts i flera olika forskningar med olika forskningsmetoder (Clarke och Reuben 1996; Leslie m.fl. 2002; Azam och McIntosh 2006). För att undersöka frisättningen av noradrenalin i hippocampus, har man främst utnyttjat synaptosomer och hjärnskivor som erhållits från möss och råttor. Luo m.fl. (1998), Azam och McIntosh (2006) och Azam m.fl. (2010) kunde även m.h.a. av conotoxiner specifika för olika nikotinreceptorunderenheter fastställa, till viss utsträckning, vilka av de olika underenheterna som är ansvariga för nikotinreceptormedierad frisättning av noradrenalin i noradrenerga nervterminaler. Detta genom att utnyttja hippocampala synaptosomer som erhållits från gnagare. Upptäckten av specifika antagonister till de olika nikotinreceptorunderenheterna, bl.a. conotoxiner, har möjliggjort forskning för att fastställa vilka olika underenheter som förmedlar noradrenalinfrisättning i hippocampus och andra områden i hjärnan (Luo m.fl. 1998).

### 1.1.3. Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i hjärnbarken

Hjärnbarken innerveras i stor utsträckning av noradrenerga LC-neuroner och bl.a. neocortex är ett av de områden som får all sin noradrenerga innervering från LC (Benarroch 2009).

Hjärnbarken är viktig för många kognitiva funktioner och har en viktig roll i patofysiologin för bl.a. Alzheimers sjukdom (Dineley m.fl. 2015).

Noradrenalinfrisättning i hjärnbarken till följd av nikotinadministrering har redan undersökts under 70-talet (Westfall 1974). Redan då kunde Westfall (1974) i sin undersökning observera att stimulering av noradrenalinfrisättning i hjärnbarken hos råttor kunde stimuleras med nikotin och att denna effekt involverade signalering med nikotinreceptorer. I forskningen undersöktes hur noradrenalin frisattes i olika hjärnområden efter behandling av vävnadsproverna med nikotin. Hur omfattande noradrenalinfrisättningen i hjärnbarken var koncentrationsberoende. Dessa resultat stämmer överens med resultat från forskning som utförts senare och på andra hjärnområden (Leslie m.fl. 2002).

Nikotininducerad noradrenalinfrisättning i olika hjärnområden hos råttor har även undersökts av Anderson m.fl. 2000. I forskningen tillämpades en ny metod där skivor från olika hjärnområden placerades i en 96-hålsplatta. Noradrenalinfrisättningen undersöktes i bl.a. hippocampus, talamus, prefrontala cortex, hypotalamus och amygdala (Tabell 1).

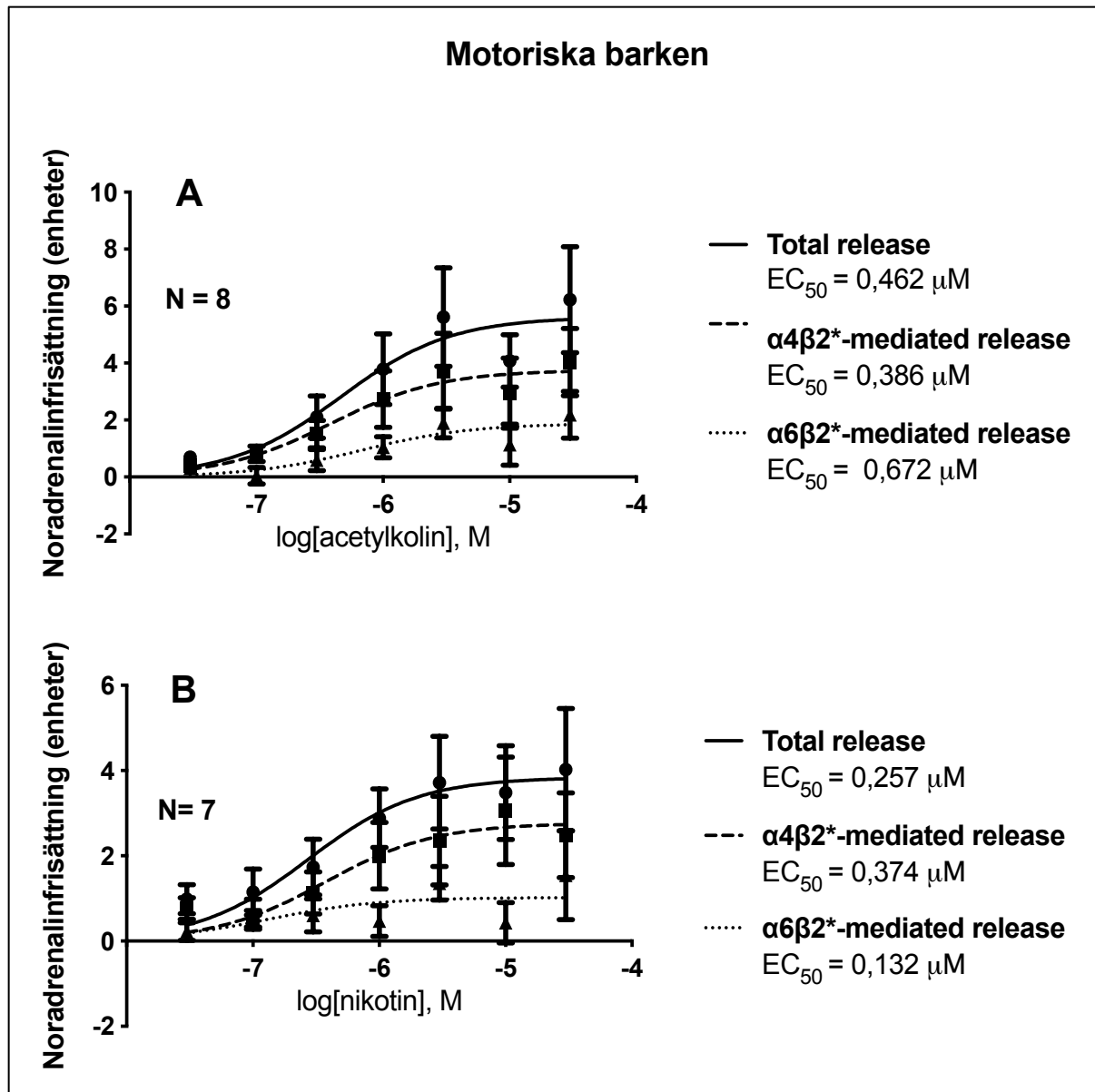
**Tabell 1. Fraktionell frisättning av noradrenalin till följd av stimulering med nikotin i olika hjärnområden hos råttor.** Frisättningen är presenterad som fraktionell frisättning av den totala radioaktiviteten i varje enskilt hål på 96-hålsplattan (Anderson m.fl. 2000 (redigerad)).

Hjärnområde	Fraktionell frisättning av noradrenalin
Hippocampus	3,5±0,8
Talamus	1,6±0,3
Amygdala	1,7±0,7
Prefrontala cortex	0,9±0,2
Hypotalamus	0,6±0,1

Frisättningen av noradrenalin i prefrontala cortex var betydligt mindre än i hippocampus, vilket stämmer överens med tidigare undersökningar (Tabell 1; Anderson m.fl. 2000). Man undersökte även hur noradrenalinfrisättningen påverkades av antagonister och agonister. Resultaten visade att de mest sannolika receptorerna som förmedlade frisättningen var  $\alpha 3\beta 4^*$ -receptorer.

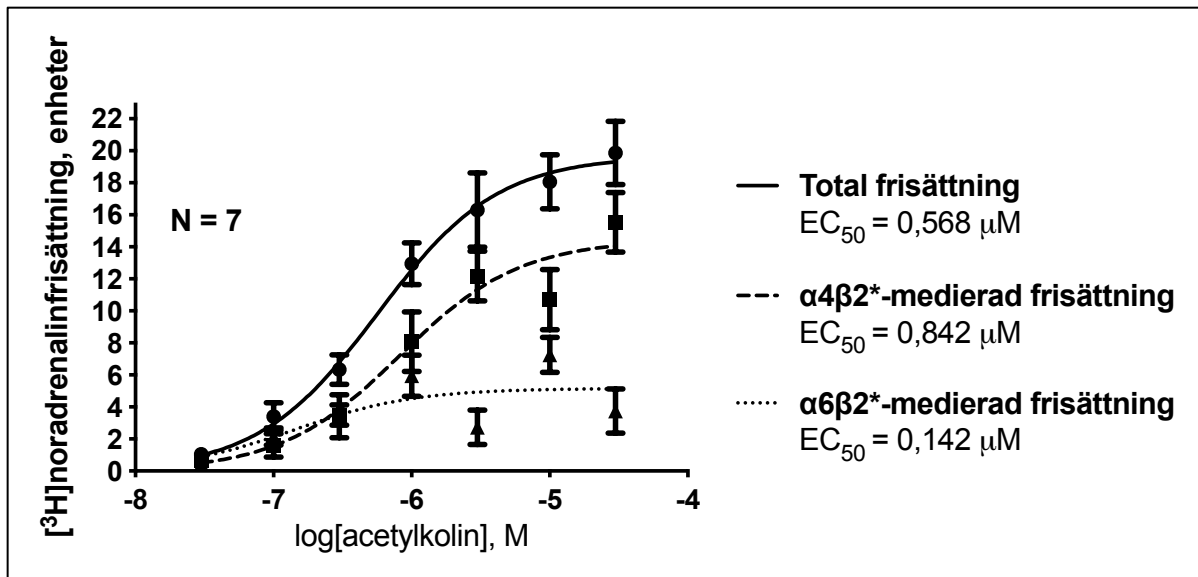
Frisättningen av flera olika signalsubstanser i olika hjärnområden hos Wistar-råttor undersöktes av m.h.a. mikrodialys av Toth m.fl. (1992). Efter administrering av nikotin mätte man frisättningen av bl.a. dopamin och noradrenalin. Gördelvindlingen, som är en del av hjärnbarken, var ett av de områden som man undersökte. I undersökningen kunde man konstatera att noradrenalin frisattes från gördelvindlingen efter nikotinadministrering. Gördelvindlingen förknippas med många olika viktiga funktioner i CNS och anses vara viktig för kognitiva funktioner, minnet och fungerar dessutom som en del av det limbiska systemet (Rolls 2019).

Noradrenalinfrisättning i prefrontala cortex och motoriska barken har också undersökts i nyare undersökningar m.h.a. synaptosomer som erhållits från möss (Salminen och Vaha, opublicerat material). Resultaten visade att noradrenalin frisätts i båda områden (Bild 1). För att ytterligare undersöka om noradrenalinfrisättningen medieras via  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer i motoriska barken och prefrontala cortex användes  $\alpha$ -conotoxin-MII ( $\alpha$ -CTX-MII) som antagonist för att blockera  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer (Champtiaux m.fl. 2003; Salminen m.fl. 2004). Blockering av  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer med  $\alpha$ -CTX-MII reducerade mängden frisatt noradrenalin från motoriska barken, men eliminerade inte den helt, vilket tyder på att  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorer, eller andra nikotinreceptorer som förmedlar  $\alpha$ -CTX-MII-resistent noradrenalinfrisättning, har en viktig roll i regleringen av noradrenalinfrisättningen i motoriska barken. Noradrenalinfrisättning förmedlad via andra nikotinreceptorer i motoriska barken kan dock inte uteslutas, men den största delen av noradrenalinfrisättningen förmedlas via  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer. Stimulering med acetylkolin ledde till mera omfattande frisättning av noradrenalin än stimulering med nikotin. Resultaten visade att den största delen av noradrenalinfrisättningen förmedlas via nikotinreceptorer som inte blockeras av  $\alpha$ -CTX-MII.



**Bild 1. Noradrenalinfrisättning medieras via  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer i den motoriska barken.** Stimulering med acetylkolin (A) och nikotin (B) av synaptosomer som erhållits från den motoriska barken ledde till noradrenalinfrisättning. Blockering av  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer med  $\alpha$ -CTX-MII reducerade noradrenalinfrisättningen i viss mån (Salminen och Vaha, opublicerat material).

(Salminen och Vaha, opublicerat material) har även undersökt noradrenalinfrisättningen i prefrontala cortex med synaptosomer från möss. Noradrenalinfrisättning från synaptosomerna till följd av stimulering med acetylkolin kunde observeras (Bild 2). Även i detta fall reducerades noradrenalinfrisättningen till viss del vid administrering av  $\alpha$ -CTX-MII.



**Bild 2. Noradrenalinfrisättning medieras via  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer i prefrontala cortex.** Stimulering med acetylcholin av synaptosomer som erhållits från motoriska barken ledde till noradrenalinfrisättning. Blockering av  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorer med  $\alpha$ -CTX-MII reducerade noradrenalinfrisättning från synaptosomerna. (Salminen och Vaha, opublicerat material)

Noradrenalinfrisättning i hjärnbarken till följd av behandling med nikotin har intressant nog även kunnat undersökas med vävnadsprover från den mänskliga hjärnan (Woo m.fl. 2002; Amtage m.fl. 2004). Woo m.fl. (2002) undersökte noradrenalinfrisättningen i hjärnbarken genom att utnyttja vävnadsprover som donerats från frivilliga försökspersoner.

För att undersöka frisättningen av noradrenalin i hjärnbarken, inkuberades skivor, som erhållits från hjärnbarken från patienter som undergick neurokirurgiskt ingrepp, med  $[^3\text{H}]$ noradrenalin (Woo m.fl. 2002). Skivorna behandlades med nikotin i olika koncentrationer. Resultaten visade att nikotin stimulerade frisättning av noradrenalin i mänskliga hjärnbarken och att frisättningen var koncentrationsberoende. Frisättningen verkade också vara  $\text{Ca}^{2+}$ -beroende, eftersom noradrenalinfrisättningen drastiskt minskade (ca 80 %) vid frånvaro av  $\text{Ca}^{2+}$ .

Resultaten från denna undersökning visade också att  $\text{EC}_{50}$ -värdet för nikotin var 15  $\mu\text{l}$ , vilket är betydligt högre jämfört med resultat från forskning med råttor (Anderson m.fl. 2000; Woo m.fl. 2002). Forskarna var inte helt säkra på den bakomliggande orsaken. Eventuellt kan det bero på skillnader mellan forskningsmetoderna, tiden man inkuberade proven med nikotin. Det är även möjligt att noradrenalinfrisättningen förmedlas via olika nikotinreceptorer i olika arter. Dessutom hade vävnadsproverna tagits från hjärnbarken från individer som led av läkemedelsresistens epilepsi. Mutationer i nikotinreceptorer hos epilepsipatienter kan

förekomma och långvarig behandling med antiepileptika kan modulera nikotinreceptorernas funktion.

För att undersöka vilka nikotinreceptorunderenheter som var involverade i noradrenalinfrisättningen, använde Woo m.fl. (2002) nikotinreceptorantagonister i sin undersökning. Dihydro- $\beta$ -erytroidin-hydrobromid (DH $\beta$ E) är en antagonist för nikotinreceptorer som inte är känsliga för  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX). Ett exempel på detta är  $\alpha$ 2 $\beta$ 4\*-receptorerna. Nikotinreceptorantagonisten  $\alpha$ -BTX blockerar bl.a.  $\alpha$ 7-underenheten och eftersom administrering av  $\alpha$ -BTX till vävnadsproverna från hjärnbarken inte blockerade frisättningen av noradrenalin, tyder det på att  $\alpha$ 7-underenheten inte är ansvarig för nikotinreceptormedierad frisättning av noradrenalin i den mänskliga hjärnbarken – trots att  $\alpha$ 7-receptorer är en av de nikotinreceptorer som förekommer i stora koncentrationer i CNS (Breese m.fl. 1997; Woo m.fl. 2002). Detta indikerar också att noradrenalinfrisättningen högst antagligen förmedlas via nikotinreceptorer som inte är känsliga för  $\alpha$ -BTX. När man administrerade DH $\beta$ E minskade dock noradrenalinfrisättningen, vilket indikerar att noradrenalinfrisättningen förmedlas via heteromeriska nikotinergera  $\alpha/\beta$ -receptorer.

Noradrenalinfrisättningen i mänskliga neocortex har också undersökts av Amtage m.fl. (2004). Deras forskning fokuserade främst på vilka underenheter i neocortex som förmedlar frisättning av noradrenalin till följd av stimulering med nikotin. De jämförde även resultaten från denna studie med tidigare undersökningar utförd på gnagare för att se om det finns skillnad mellan olika arter. Tidigare forskning har främst använt gnagare och enligt denna undersökning var den enda forskningen som tidigare undersökt noradrenalinfrisättningen i den mänskliga hjärnbarken den som utfördes av Woo m.fl. (2002), som främst fokuserade på mekanismerna bakom nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning.

Vävnadsprover från neocortex erhöles på samma sätt, som i forskningen utförd av Woo m.fl. (2002), under ett neurokirurgiskt ingrepp från frivilliga individer (Amtage m.fl. 2004). Vävnadsproverna skars sedan i tunna skivor. För att kunna jämföra resultaten från mänskliga neocortex, använde man även skivor som erhöles från Wistar-råttor (neocortex och hippocampus). Skivorna preinkuberades sedan med [ $^3$ H]-noradrenalin.

Resultaten visade att noradrenalin frisattes i mänskliga neocortex och i både neocortex och hippocampus hos råttor (Amtage m.fl. 2004). Man kunde konstatera att noradrenalin i råttornas

neocortex inte frisattes i samma utsträckning som i proverna tagna från mänskliga neocortex. Detta indikerar att det finns skillnader mellan olika arter och att resultat från undersökningar gjorda med hjärnbarken från råttor inte stämmer överens med resultat från forskning där man använt den mänskliga hjärnbarken (Woo m.fl. 2002). Amtage m.fl. 2004).

Amtage m.fl. (2004) jämförde även om olika nikotinagonister stimulerade noradrenalinfrisättning i samma rangordning i människor och råttor. Man valde att inte undersöka proverna från rättans neocortex, eftersom det ingen avgörande mängd noradrenalin frisattes i de försöken. Resultaten visade att de olika nikotinagonisterna stimulerade noradrenalinfrisättning i samma rangordning hos råttor och människor. Den enda skillnaden var att cytisin stimulerade nikotinfrensättning i högre grad i mänskliga hjärnbarken.

Till sist undersökte Amtage m.fl. (2004) också vilka nikotinreceptorunderenheter som deltog i den nikotinreceptormedierade noradrenalinfrisättningen. Detta undersöktes m.h.a. nikotinantagonister. Eftersom glutamatreceptorantagonister hämmade noradrenalinfrisättningen i mänskliga neocortex, kunde man anta att en del av noradrenalinmängden som frisattes till följd av nikotinstimulering också förmedlas via nikotinreceptor i glutamaterga neuroner och inte enbart noradrenerga neuroner. En av antagonisterna som användes var  $\alpha$ -CTX-MII, som blockerar  $\alpha 3\beta 2^*$ - och  $\alpha 6^*$ -receptorer. Administrering av  $\alpha$ -CTX-MII ledde till reducering av noradrenalinfrisättning i mänskliga neocortex, vilket tyder på att  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  och  $\beta 2$  är viktiga förmedlare av noradrenalinfrisättning i neocortex hos människor. Antagonister som blockerar  $\alpha 7$ -homomeriska receptorer hämmade inte frisättningen av noradrenalin, vilket stämmer överens med resultaten från undersökningen med råttor utförd av Woo m.fl. (2002). Amtage m.fl. (2004) upptäckte även att  $\alpha 3\beta 4^*$ -receptorspecifika antagonisterna  $\alpha$ -CTX- AuIB inte blockerade noradrenalinfrisättningen i mänskliga neocortex, trots att resultat från forskning med råttor har visat motsatsen. Ytterligare visade resultaten att  $\beta 4$ -underenheten antagligen också är involverad i den nikotinreceptormedierade noradrenalinfrisättning i mänskliga neocortex. Utgående ifrån forskningsresultaten kunde man anta att de receptorer som förmedlar noradrenalinfrisättning i neocortex är  $\alpha 3\beta 2$ - och  $\alpha 6\beta x$ -receptorer, dessutom är nikotinreceptorer med  $\beta 4$ -underenheten (t.ex.  $\alpha 4\beta 4^*$ -receptorer) antagligen också involverade.



#### 1.1.4. Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i amygdala

Trots att noradrenalinfrisättningen främst har undersökts i hippocampus, har även andra delar av det limbiska området undersökts (Anderson m.fl. 2000; Amtage m.fl. 2004). Amygdala innerveras av noradrenerga neuroner från både LC och solitärkärnan i hjärnstammen. När Anderson m.fl. (2000) undersökte noradrenalinfrisättning till följd av nikotinadministrering hos råttor, undersöktes även amygdalan. Resultaten visade att noradrenalinfrisättningen inte var lika omfattande som i hippocampus, men jämfört med regioner som hypotalamus och prefrontala cortex, frisattes det dock mera (Tabell 1). Man undersökte inte vilka receptorer som förmedlade effekten av nikotinstimulering, men det är troligt att  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorer åtminstone är involverade (Anderson m.fl. 2000; Posadas m.fl. 2013).

Noradrenalinfrisättningen i amygdala har även undersökts med *in vivo* av Fu m.fl. (1998) m.h.a. mikrodialys. Undersökningen utfördes genom att placera en sond vid de hjärnområden som man vill analysera (amygdala och hippocampus). Nikotinadministrering aktiverade områden i hjärnstammen vilket ledde till noradrenalinfrisättning i både amygdala och hippocampus. Noradrenalinfrisättningen i båda områden var koncentrationsberoende.

Fu m.fl. (1998) undersökte även vilka nikotinreceptorunderenheter som var involverade i noradrenalinfrisättningen i amygdala. Administrering av  $\alpha$ -BTX hämmade inte frisättningen i varken amygdala eller hippocampus, vilket tyder på att  $\alpha 7$ -homomeriska receptorer sannolikt inte förmedlar noradrenalinfrisättningen, utan att detta förmedlas via andra receptorer – högst sannolikt heteromeriska nikotinreceptorer. De sannolika receptorunderenheterna som förmedlade noradrenalinfrisättningen i amygdala, baserat på resultaten till följd av administrering av nikotinantagonister, antogs vara  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ .

#### 1.1.5. Nikotinreceptormedierad noradrenalinfrisättning i hypotalamus

Noradrenalinfrisättning i hypotalamus, som också utgör en del av det limbiska systemet i hjärnan, har kunnat undersökas med synaptosomer och hjärnskivor (Yoshida m.fl. 1980; Anderson m.fl. 2000). I båda undersökningarna använde man råttor. Hall och Turner (1972) undersökte däremot noradrenalinfrisättningen i hypotalamus hos katter till följd av nikotinstimulering.

Yoshida m.fl. (1980) använde Wistar-råttor för att undersöka noradrenalinfrisättningen med hypotalamiska synaptosomer. Även i denna undersökning kunde man konstatera att nikotin

stimulerar noradrenalinfrisättning i hypotalamiska synaptosomer och att frisättningen var koncentrationsberoende. Nikotinreceptorantagonisten mecamylamin reducerade frisättning av noradrenalin från de hypotalamiska synaptosomerna. Mecamylamin har konstaterats att bl.a. blockera  $\alpha 42\beta^*$ -receptorer – med andra ord är det möjligt att detta är en av viktiga nikotinreceptorerna i hypotalamus (McKee m.fl. 2009; Posadas m.fl. 2013). Noradrenalinfrisättning till följd av nikotinstimulering ökar också i hypotalamus hos katter enligt undersökningen gjord av Hall och Turner (1972).

Noradrenalinfrisättningen i hypotalamiska skivor som erhållits från råttor var inte omfattande i undersökningen utförd av Anderson m.fl. (2000), dock var frisättningen tillräcklig för att kunna mäta. Av de områden som undersöktes var noradrenalinfrisättningen lägst i hypotalamus till följd av nikotinstimulering (Tabell 1).

## 2. MATERIAL OCH METODER

### 2.1. Frisättning av neurotransmittorer från synaptosomer

Synaptosomer är isolerade synaptiska nervterminaler från neuroner, som bereds genom att homogenisera vävnadsprover från hjärnområden (Whittaker m.fl. 1964; Raiteri och Raiteri 2000). Synaptosomer har främst använts för att undersöka frisättning av neurotransmittorer från nervterminaler, men synaptosomer lämpar sig även för undersökning av bl.a. transport av neurotransmittorer, interaktion mellan receptorer och lokalisering av receptorer. Utveckling av forskningsmetoder som involverar synaptosomer, har framförallt underlättat undersökning av frisättning av neurotransmittorer till följd av stimulering av presynaptiska receptorer. Forskning med synaptosomer har även bidragit med viktig information om farmakologiska substanser och deras förmåga att både direkt och indirekt stimulera frisättning av neurotransmittorer.

Hebb och Whittaker (1958) isolerade synaptosomer första gången i en undersökning som fokuserade på acetykolinetns distribution i CNS. Synaptosomer definierades senare på 60-talet av Whittaker m.fl. (1964). Sedan dess, har forskning med synaptosomer utvecklats och bidragit värdefull information om bl.a. neurotransmittorer och deras frisättning i CNS. När vävnadsprover från hjärnan homogeniseras under isotona förhållanden, separeras presynaptiska nervterminaler som bibehåller största delen av nervterminalernas struktur och funktioner.

### 2.1.1. Dopaminfrisättning från synaptosomer

Det dopaminerga systemet i hjärnan har under flera år varit ett populärt föremål för forskning (Arias-Carrión m.fl. 2010). Forskning med synaptosomer har bidragit med värdefulla insikter om dopaminets frisättning i olika hjärnområden (Evans 2015). Förändringar i det dopaminerga systemet är involverade i patofysiologin för flera olika neurologiska- och neurodegenerativa sjukdomar (Arias-Carrión m.fl. 2010). Speciellt har forskning angående det dopaminerga systemet undersökt nikotinreceptorernas förmåga att reglera dopaminfrisättning med synaptosomer (Clarke och Pert 1985; Grady m.fl. 2002). De nigrostriatala- och mesolimbiska banorna är de viktigaste dopaminerga banorna i det dopaminerga systemet och dopaminfrisättning i dessa banor regleras åtminstone till viss del av de presynaptiska nikotinreceptorerna. Främst har dopaminfrisättning undersökts med synaptosomer från gnagare (möss och råttor), men även postmortem-undersökningar med mänskliga synaptosomer har utförts (Evans 2015; Jhou och Tai 2017). Dopaminfrisättning förmedlad av presynaptiska nikotinreceptorer har undersökts med synaptosomer från bl.a. striatum, substantia nigra och accumbenskärnan (Rapier m.fl. 1990; Grady m.fl. 2002).

Rapier m.fl. (1990) undersökte dopaminfrisättning från striatala synaptosomer. Som försöksdjur användes råttor. Synaptosomerna stimulerades med både agonister och antagonister för att undersöka deras effekt på dopaminfrisättningen. Som agonister användes bl.a. nikotin och cytisin. Båda agonisterna stimulerade frisättning av dopamin från de striatala synaptosomerna. Antagonister som användes för att undersöka deras inhiberande effekt på dopaminfrisättningen, var bl.a. mecamlamin och  $\alpha$ -BTX. Mecamlamin inhiberade dopaminfrisättning i större utsträckning än de andra antagonisterna som användes i undersökningen.

Frisättning av dopamin från striatala synaptosomer som erhållits från möss har också undersökts (Grady m.fl. 2002). Förutom frisättningen från striatala synaptosomer, undersöktes också frisättningen från synaptosomer från andra hjärnområden. De andra områden som undersöktes var luktupphöjningen (tuberculum olfactorium), accumbenskärnan och den frontala barken. Dopaminfrisättning från synaptosomer kunde observeras för alla områden som man undersökte, men dopaminfrisättningen från synaptosomerna som erhållits från frontala barken var betydligt mindre jämfört med de andra områden. I denna undersökning användes bl.a. nikotin som agonist för att stimulera frisättningen. Detta stämmer överens med tidigare forskning som också jämfört dopaminfrisättning i frontala barken och t.ex. striatum (Whiteaker

m.fl. 1995). Nikotinantagonister användes också för att undersöka inhibering av dopaminfrisättning i de olika hjärnomsrådena (Grady m.fl. 2002). Samma forskning undersökte även dopaminfrisättning till följd av nikotinstimulering med synaptosomer från  $\beta 2$ -KO-möss. Nikotinstimulering av synaptosomer från KO-mössen ledde inte till dopaminfrisättning, vilket innebär att en signifikant andel av dopaminfrisättning i de olika hjärnomsråden som undersöktes förmedlas via nikotinreceptorer med  $\beta 2$ -underenheter. Antagonisterna som inhiberade dopaminfrisättningen pekade också på att nikotinreceptorer med  $\beta 2$ -underenheter är essentiella för dopaminfrisättningen i de undersökta hjärnomsråden.

Striatala synaptosomer från råttor har också använts för att studera distribution av nikotinreceptorer och vilka underenheter som förmedlar dopaminfrisättning från dopaminerga neuroner (Azam och McIntosh 2004). Genom att använda olika konotoxiner som binder till specifika nikotinreceptorunderenheter kunde man undersöka vilka underenheter som är ansvariga för dopaminfrisättning från dopaminerga nervterminaler. Tidigare forskning pekade på en viktig roll för  $\alpha 3^*$ -receptorer i de dopaminerga nervterminalerna (Kulak m.fl. 1997), men undersökningen utförd av Azam och McIntosh (2004) visade att  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer antagligen har en viktigare roll när det kommer till reglering av dopaminfrisättningen i de nigrostriatala banorna.

Synaptosomer kan också användas för att studera nikotinreceptorer och deras roll i olika funktioner i CNS (Marks m.fl. 2014). Forskarna i denna undersökning kunde konstatera att kronisk nikotinadministrering leder till uppreglering av  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorer, medan nedreglering av  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer kunde observeras. Dessa receptorer förmedlar dopaminfrisättning i bl.a. mesolimbiska banor, som har en viktig roll i utveckling av beroenden. (Marks m.fl. 2014; Evans 2015). Synaptosomerna möjliggör med andra ord även undersökning av receptorernas funktion i olika fysiologiska fenomen och deras roll i patofysiologin för olika sjukdomar.

### 2.1.2. GABA-frisättning från synaptosomer

En annan signalsubstans och frisättning av den som har undersökts m.h.a synaptosomer är GABA (Raiteri och Raiteri 2000). Nikotinreceptorer förmedlar även GABA-frisättning i CNS. Detta har undersökts av bl.a. McClure -Begley m.fl. (2009). Frisättning av GABA från murina synaptosomer som erhållits från talamus, hjärnbarken, hippocampus och striatum. För att undersöka frisättningen av GABA, användes acetylkolin för att stimulera synaptosomerna. För att kunna undersöka olika nikotinreceptorunderenheter och deras roll som förmedlare av

GABA-frisättning i de olika hjärnområden, använde man KO-möss. Resultaten visade att GABA frisattes i alla de områden som man undersökte. Resultaten visade också att inget GABA frisattes till följd av stimulering med acetylcholin från synaptosomer som erhållits från  $\alpha 4$ -KO-möss. Detta kunde också observeras i synaptosomer som erhållits från  $\beta 2$ -KO-möss. Resultaten visade att de viktigaste nikotinreceptorerna som reglerar frisättning av GABA i de undersökta hjärnområden är  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorer.

McClure-Begley m.fl. (2009) kunde även observera minskad GABA-frisättning i synaptosomer som erhållits från  $\alpha 5$ -KO-möss. Resultaten visade eliminering av  $\alpha 5$ -kodande genen signifikant reducerade GABA-frisättning från de synaptosomer som erhållits från hjärnbarken. GABA-frisättningen i striatum och hippocampus minskade, men i talamus var frisättningen inte signifikant reducerad.

Förutom att undersöka GABA-frisättningen i de redan nämnda hjärnområden med synaptosomer, har frisättningen i superior colliculi också undersökts (McClure-Begley m.fl. 2009). Dessutom undersöktes även vilka nikotinreceptorer som var involverad i frisättningen av GABA i detta område m.h.a. KO-möss. För att stimulera GABA-frisättningen från de murina synaptosomerna användes acetylcholin. Eliminering av  $\beta 2$ -underenheten eliminerade nästan totalt GABA-frisättningen till följd av stimulering med acetylcholin och minskade signifikant när  $\alpha 4$ -underenheten eliminerades. Frisättningen i GABA påverkades dock inte av eliminering av  $\beta 3$ -underenheten, som har visat ha signifikant betydelse i dopaminerga banor (Salminen m.fl. 2007; McClure-Begley m.fl. 2009).

## 2.2. Material

De material som användes i undersökning och deras leverantörer räknas upp här. L-askorbinsyra, atropinsulfat (monohydrat) Sigma-Aldrich, Kina. Acetylcholin klorid: Sigma-Aldrich, Schweiz. Pargylin-hydroklorid: Sigma-Aldrich, Tyskland. D-(+)-Glukos, kaliumdivätefosfat 4-(2-hydroxyetyl)-piperazin-1-etansulfonsyra (HEPES), bovint serumalbumin (BSA), HEPES-natriumsalt: Sigma-Aldrich, USA. Nomifensinmaleat: Sigma-Aldrich, Israel. Magnesiumsulfatheptahydrat: Sigma-Aldrich, Indien. Kaliumklorid, sukros: Merck, Tyskland. Natriumklorid: Merck, Danmark. 3,4-[2,5,6- $^3$ H]-Dihydroxyfenyletylamin ( $^3$ H)dopamin): PerkinElmer, Boston, USA. Diospropylfluorofosfat: Sigma-Aldrich, Slovakien. Renat vatten : Millipore Simplicity, (Millipore, USA).  $\alpha$ -Conotoxin-MII och vareniklin skänktes åt Helsingfors universitet av Orion.

### 2.3. Försöksdjur

Som försöksdjur användes 3-5 månader gamla C57BL/6JRccHsd-hanmöss (Envigo, Nederländerna). Alla experiment och undersökningar utfördes i överensstämmelse med europeiska och lokala riktlinjer för hantering av försöksdjur ämnade för vetenskapligt bruk. Försöksdjuren placerades i burar med högst två möss åt gången i rumstemperatur (20-22 °C). En 12 timmars ljuscykel upprätthölls och de hade tillgång till vatten och mat *ad libitum*.

### 2.4. Forskningsmetod

#### 2.4.1. Synaptosomperfusionsapparaturens funktion

För att undersöka dopaminfrisättningen till följd av stimulering med acetylkolin och vareniklin användes homogeniserade vävnadsprover från striatum. Synaptosomer är isolerade nervterminaler som till följd av homogenisering bibehåller de viktigaste strukturerna och funktionerna (Whittaker m.fl. 1964; Raiter och Raiteri 2000). För att undersöka frisättningen från synaptosomer, användes synaptosomperfusionsapparaten i isotoplaboratoriet (Farmaceutiska fakulteten: Avdelningen för farmakologi och farmakoterapi) vid Helsingfors universitet. Apparaten möjliggör undersökning av frisättning av radioaktiva neurotransmittorer från synaptosomer efter stimulering med olika behandlingar.

Apparaten består av ett vattenbad (VWR WB6 ; VWR International Radnor PA, USA), som används vid inkubering av synaptosomer, där upptag av radioaktivt märkta neurotransmittorer i synaptosomer äger rum. Apparaten har även åtta hållare av plast (PALL Life Sciences, Ann Arbor MI, USA), som filterpapprena kan placeras på (PALL LIFE Sciences, glasfiber, filterstorlek: 1 µl). Under experimentet kan synaptosomer som innehåller radioaktivt märkt signalsubstans pipetteras på dessa filterpapper. Tre peristaltiska pumpar, som också hör till apparaten, pumpar buffertlösning på filterpapprena under experimentet och ytterligare en peristaltisk pump används för att suga buffertlösningen genom synaptosomerna (Gilson Minipuls 3; Gilson Middleton WI, USA). För att leda buffertlösning genom synaptosomerna på filterpapprena, används en kontrollpanel med åtta kranar som möjliggör kontroll av buffertlösningarnas passage genom apparatens filterhållare. Via kontrollpanelen kan buffertlösningarna även styras till apparatens fraktionssamlare (Gilson FC204, Gilson), som möjliggör uppsamling av buffertlösningen som styrts genom synaptosomerna på filterpapprena.

Buffertlösningen kan m.h.a. fraktionssamlaren samlas på 96-hålsplattor (200 µl/hål; PerkinElmer, Gröningen, Nederländerna).

De tre första peristaltiska pumparna är ämnade för buffertlösningarna som perfuserar synaptosomerna. Den första pumpen är ämnad för perfusionsbuffertlösningen, den andra för buffertlösningen som innehåller aktiva substanser man vill undersöka (stimulerande buffertlösning) och den tredje för möjlig förbehandling (förbehandlingsbuffertlösning). Genom alla pumpar passerar åtta olika slangar (linjer), som löper genom filterhållarna. Detta möjliggör t.ex. samtidig mätning av åtta olika koncentrationer av samma stimulerande behandling. Kontrollering av de olika buffertlösningarna och styrning av dem genom filterhållarna görs med kontrollpanelens trevägskranar som är fästa på en plastskiva.

Kontrollpanelen och kranarna ger möjligheten att välja vilka av de tre olika lösningarna som man vill perfusera synaptosomerna med. Den valda perfusionslösningen droppar i jämn hastighet på filterhållarna med synaptosomerna. De två andra lösningarna löper samtidigt genom slangarna till andra kärl istället för att löpa genom filterhållarna. Perfusionsbuffertlösningen styrs till avfallskärl när kranarna är stängda, medan den stimulerande buffertlösningen och buffertlösningen som används vid förbehandling av synaptosomerna styrs tillbaka till sina ursprungliga kärl. Detta för att spara på respektive lösningar. Den fjärde pumpen suger konstant upp lösningarna som perfuserar synaptosomerna på filterhållarna. Detta möjliggör perfusion av synaptosomerna. Lösningen som styrs igenom filterhållarna kan styras till avfallskärl eller tas till vara på 96-hålsplattor med fraktionssamlaren.

Perfusion av synaptosomer genomförs ofta genom att först perfusera synaptosomerna med perfusionsbuffertlösningen, sedan med alternativ förbehandlingsbuffertlösning och sedan med den stimulerande buffertlösningen. Till sist perfuseras synaptosomerna ytterligare än gång med perfusionsbuffertlösningen, som sedan samlas upp av fraktionssamlaren. Lösningen som samlats upp på 96-hålsplattor m.h.a. fraktionssamlaren, analyseras sedan genom att mäta radioaktiviteten i den uppsamlade lösningen. Detta för att undersöka om de substanserna man undersökt lett till neurotransmittorfrisättning från synaptosomerna.

#### 2.4.2. Förberedning av synaptosomer från striatum

För att undersöka frisättningen av dopamin från striatala synaptosomer förbereddes s.k. P1-synaptosompellets. Mössen (2 stycken) avlivades med cervikal dislokation och sedan

dissekerades hjärnorna ut ur skallen. De dissekerade hjärnorna placerades på ett iskallt och fuktigt papper. Striatum från båda hjärnhalvorna separerades sedan från den övriga hjärnvävnaden som slängdes bort. Vilka delar av striatum som togs till vara definierades inte i denna undersökning. Striatum från båda hjärnhalvorna från samma mus placerades i provrör som innehöll 500 µl iskall homogeniseringslösning (2,5 M sukros, H<sub>2</sub>O, 50 mM HEPES, pH 7,5). Efter det, homogeniserades vävnadsproverna för hand med en glas-teflon-homogenisator. Homogeniserade prover överfördes sedan i 2 milliliters provrör. I samma provrör tillsattes även homogeniseringslösning som använts för att skölja ur homogenisatorn. Homogenisatorn sköljdes två gånger (2 x 500 µl homogeniseringslösning). De homogeniserade striatumproverna delades sedan i två provrör - striatum från samma mus delades i två provrör, sammanlagt erhöles därmed fyra provrör med homogeniserade vävnadsprover som numrerades: 1A, 1B, 2A, 2B (1A-B från samma mus och 2A-B från den andra). Dessa fyra provrör centrifugerades sedan (12000 g, 4 °C, 20 min; Eppendorf Centrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Efter centrifugeringen förvarades proverna nedsänkta i is. Vid perfusion av synaptosomerna användes innehållet i provrören en gång, sammanlagt genomfördes perfusion av synaptosomerna i fyra omgångar.

#### 2.4.3. Upptag av radioaktivt dopamin i synaptosomer

Efter centrifugeringen resuspenderades P1-pelletsen i 800 µl upptagsbuffert (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 glukos, 1 mM askorbinsyra, 10 µM pargylin). Suspensionen inkuberades därefter i 10 minuter i 37 °C varmt vattenbad. Efter inkuberingen tillsattes 4 µl [<sup>3</sup>H]dopamin (specifik radioaktivitet 55,0 Ci/mmol) och 4 µl DFP (2 mM), för att inhibera acetylkolinesteras. Efter detta inkuberades suspensionen igen i 5 minuter i 37 °C varmt vattenbad.

#### 2.4.4. Frisättning av radioaktivt dopamin från synaptosomer

Dopaminfrisättningen från striatala synaptosomer undersöktes i rumstemperatur. Synaptosomerna, som innehöll radioaktivt [<sup>3</sup>H]dopamin, pipetterades på filter som placerades på filterhållarna. Alla åtta linjer användes och synaptosomerna pipetterades därmed på alla åtta filterhållare (80 µl/filterpapper). Efter att synaptosomerna pipetterats på filterpapprena påbörjades genast perfusion av synaptosomerna med perfusionsbuffertlösningen, som innehöll upptagsbuffertlösning och 1 µM atropin, 1 µM nomifensin och BSA. Perfusionshastigheten var ca 0,8 ml/min och perfusionen pågick i 10 minuter. Förbehandling med α-CTX-MII



genomfördes genom att perfusera utvalda filterhållare med perfusionslösning som innehöll 50 nM  $\alpha$ -CTX-MII under de tre sista minuterna (7 min perfusionsbuffertlösning + 3 min förbehandling). För att uppnå en viss nivå av randomisering förbehandlades olika filterhållare under varje experiment. Efter att synaptosomerna perfuserats i 10 minuter, perfuserades alla filterhållare med den stimulerande buffertlösningen i 20 sekunder. Den stimulerande buffertlösningen innehöll utvalda koncentrationer av den substansen som undersöktes. Alla åtta filterhållare behandlades med olika koncentrationer av den stimulerande buffertlösningen. Även de stimulerande buffertlösningarna med olika koncentrationer användes i randomiserad ordning. Efter perfusion med den stimulerande buffertlösningen, fortsattes perfusion av synaptosomerna med perfusionsbuffertlösningen och frisatt [ $^3$ H]dopamin från synaptosomerna samlades m.h.a. fraktionssamlaren på 96-hålsplattor (ca 10 sekunders fraktioner). I varje hål på 96-hålsplattan tillsattes 150  $\mu$ l scintillationslösning (Optiphase Supermix; PerkinElmer, USA). Därefter täcktes med plastfilm och vändes sedan upp och ner några gånger för att blanda om innehållet. Innehållets radioaktivitet i de individuella hålen på 96-hålsplattorna mättes med vätskescintillationsräknare (2450-0020 Microbeta; PerkinElmer, Singapore).

Med metoden som beskrivits ovan undersöktes [ $^3$ H]dopaminfrisättningen från striatala synaptosomer till följd av stimulering med nikotinreceptoragonisterna acetylkolin och vareniklin. I båda fallen användes 50 nM  $\alpha$ -CTX-MII för att förbehandla synaptosomerna. På detta sätt, kunde resultaten delas in i  $\alpha$ -CTX-MII-känslig ( $\alpha 6\beta 2^*$ -förmedlad) och -resistent ( $\alpha 4\beta 2^*$ -förmedlad) frisättning av [ $^3$ H]dopamin. För att undersöka frisättningen av acetylkolin användes sju olika koncentrationer (0,03  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M och 30  $\mu$ M). Som kontroll användes  $K^+$ -lösning, sammanlagt användes alltså alla linjer i synaptosomperfusionsapparaten. Samma koncentrationer användes för vareniklin och även här användes  $K^+$  som kontroll för att försäkra att [ $^3$ H]dopamin frisattes från synaptosomerna.

#### 2.4.5. Analys av resultaten

Resultaten som erhöles med vätskescintillationsräknaren analyserades med en källkod som utarbetats på Colorado universitet med den statistiska arbets- och programmeringsmiljön R (version 2.15.2.; R Core Team). Vätskescintillationsräknaren räknade mängden signaler som mättes från varje hål på 96-hålsplattorna. De uppmätta signalerna per tidsfraktion presenterades i form av grafer. Grafens topp, som kunde observeras till följd av stimulering med de använda agonisterna, identifierades genom visuell inspektion av graferna. För att bestämma baseline, användes fraktionerna som samlats innan och efter toppen. De sammanlagda fraktionerna för

toppen kunde räknas ut genom att subtrahera baselinevärdet från resultaten för att bestämma frisättning i enheter för de olika koncentrationerna som undersökts. För att räkna ut  $\alpha 4\beta 2^*$ -förmedlade frisättningen av dopamin, subtraherades frisättningen som observerats efter förbehandling med  $\alpha$ -CTX-MII från den totala frisättningen. Dosresponsresultaten flyttades över till GraphPad Prism-programmet (version 9.0.0; GraphPad Software, La Jolla CA, USA) för att analysera resultaten med icke-linjär regressionsanalys. Med hjälp av den icke-linjära regressionsanalysen kunde resultaten från frisättningsexperimenten sättas in i följande ekvation:

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

I ekvationen står Y för den uppmätta frisättningen av dopamin, X står för den logaritmiska koncentrationen av den undersökta substansen (i detta fall vareniklin eller acetylkolin),  $R_{min}$  står för minimumfrisättning och  $R_{max}$  står för den maximala frisättningen.  $EC_{50}$  står för den koncentration som åstadkommer 50 % av den maximala responsen och  $H_i$  står för Hill-termen (Hill-slope).

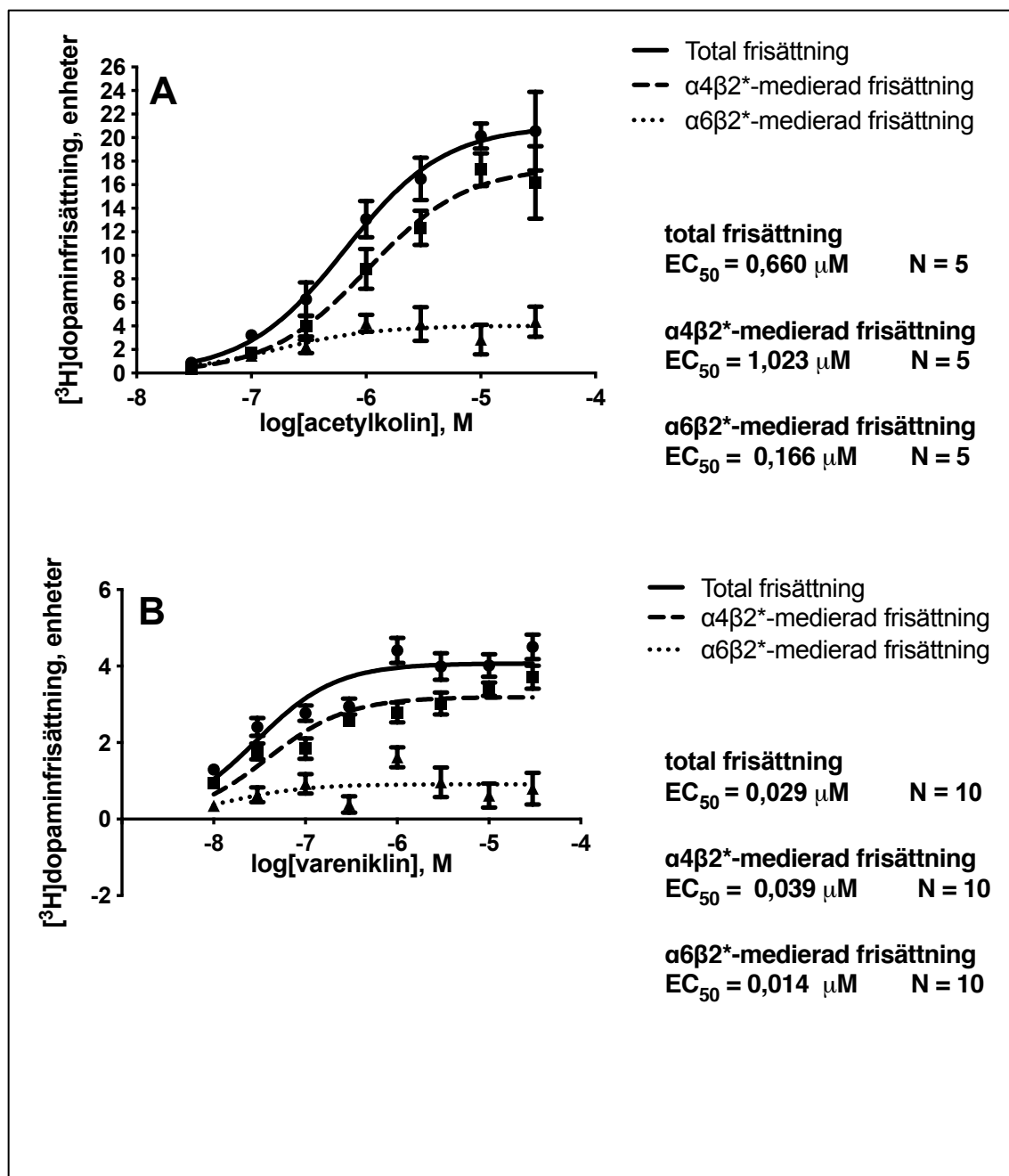
### 3. RESULTAT

#### 3.1. Dopaminfrisättning till följd av stimulering av nikotinreceptorer med agonister

Behandling av de striatala synaptosomerna från möss med acetylkolin (Bild 3A) och vareniklin (Bild 3B) stimulerade [ $^3$ H]dopaminfrisättning. Frisättningen av [ $^3$ H]dopamin till följd av stimulering med acetylkolin och vareniklin var koncentrationsberoende. Olika värden för dopaminfrisättningen till följd av stimulering med acetylkolin och vareniklin är presenterade i Tabell 2.  $EC_{50}$ -värden ( $EC_{50}$  = koncentrationen av acetylkolin och vareniklin som krävdes för att åstadkomma 50 % av den maximala responsen), den maximala frisättningen och standardavvikelse för dessa värden kan avläsas ur tabellen. [ $^3$ H]Dopaminfrisättningen till följd av stimulering med acetylkolin var betydligt större än för vareniklin (acetylkolin:  $R_{max} = 21,0 \pm 1,2$ ; vareniklin:  $R_{max} = 4,072 \pm 0,14$ ). Koncentrationen som krävdes för att stimulera [ $^3$ H]dopaminfrisättningen från de striatala synaptosomerna var högre för vareniklin ( $logEC_{50} = -7,54 \pm 0,10$ ) än för acetylkolin ( $logEC_{50} = -6,18 \pm 0,11$ ). Dopaminfrisättningen från de striatala

synaptosomerna delades in i total-  $\alpha 4\beta 2^*$ -medierad-, och  $\alpha 6\beta 2^*$ -medierad frisättning (Bild 3; Tabell 2).

Blockering av  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer med  $\alpha$ -CTX-MII ( $\alpha$ -CTX-MII-känslig frisättning), ledde till minskad [ $^3\text{H}$ ]dopaminfrisättning till följd av stimulering med acetylkolin och vareniklin (acetylkolin +  $\alpha$ -CTX-MII:  $R_{\max} = 4,0 \pm 0,5$ ; vareniklin +  $\alpha$ -CTX-MII:  $R_{\max} = 0,912 \pm 0,14$ ). Den  $\alpha$ -CTX-MII-resistenta dopaminfrisättningen var större både efter stimulering med vareniklin och acetylkolin. Den  $\alpha$ -CTX-MII resistenta delen av den acetylkolinstimulerade [ $^3\text{H}$ ]dopaminfrisättningen utgjorde ca 80 % av den totala frisättningen och ca 78 % av den vareniklinstimulerade [ $^3\text{H}$ ]dopaminfrisättningen från de striatala synaptosomerna.



**Bild 3. Acetylcholin och vareniklin stimulerar  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -medierad  $[^3\text{H}]$ dopaminfrisättning i striatala synaptosomer.** Synaptosomerna perfuserades med bufferlösning i 10 minuter och under de 3 sista minuterna användes en bufferlösning som innehöll  $\alpha$ -CTX MII. Efter perfusion i 10 minuter, stimulerades synaptosomerna med acetylcholin (A) eller vareniklin (B) i 20 sekunder, varefter  $[^3\text{H}]$ dopaminfrisättningen mättes. För att bestämma den  $\alpha$ -CTX MII-resistenta frisättningen av dopamin ( $\alpha 4\beta 2^*$ -medierad frisättning), subtraherades  $[^3\text{H}]$ dopaminfrisättningen efter förbehandling med  $\alpha$ -CTX MII med  $[^3\text{H}]$ dopaminfrisättningen som mättes utan förbehandling med  $\alpha$ -CTX MII ( $\alpha 6\beta 2^*$ -medierad). Graferna är skapade genom att analysera den genomsnittliga  $[^3\text{H}]$ dopaminfrisättningen från de striatala synaptosomerna med en icke-linjär regressionsanalys.  $\text{EC}_{50}$  = Den koncentration som åstadkommer 50 % av den maximala effekten

**Tabell 2. Värden för total-,  $\alpha 4\beta 2^*$ -medierad-, och  $\alpha 6\beta 2^*$ -medierad [ $^3\text{H}$ ]dopaminfrisättning från striatala synaptosomer till följd av stimulering med acetylkolin och vareniklin. Värdena är uträknade med icke-linjär regressionsanalys. Värdena för dopaminfrisättning stimulerad av acetylkolin och vareniklin, deras  $\text{EC}_{50}$ -värden, maximala frisättning ( $R_{\text{max}}$ ), antalet försöksdjur (N), logaritmska  $\text{EC}_{50}$ -värdet ( $\log \text{EC}_{50}$ ).  $\alpha$ -CTX MII =  $\alpha$ -conotoxin MII**

	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\log \text{EC}_{50}$ $\pm$ standard- avvikelse	$\text{EC}_{50}$ 95 % konfidensintervall ( $\mu\text{M}$ )	$R_{\text{max}}$ (enheter) $\pm$ standard- avvikelse	N
Acetylkolin (total)	0,660	-6,18 $\pm$ 0,11	0,39-1,12	21,0 $\pm$ 1,2	5
+ $\alpha$ -CTX MII ( $\alpha 4\beta 2^*$ - medierad)	1,023	-5,99 $\pm$ 0,13	0,55-1,90	17,6 $\pm$ 1,3	5
- $\alpha$ -CTX MII ( $\alpha 6\beta 2^*$ - medierad)	0,166	-6,78 $\pm$ 0,31	0,038-0,72	4,0 $\pm$ 0,5	5
Vareniklin (total frisättning)	0,029	-7,54 $\pm$ 0,10	0,018-0,046	4,072 $\pm$ 0,14	10
+ $\alpha$ -CTX MII ( $\alpha 4\beta 2^*$ - medierad)	0,039	-7,41 $\pm$ 0,11	0,024-0,064	3,190 $\pm$ 0,12	10
- $\alpha$ -CTX MII ( $\alpha 6\beta 2^*$ - medierad)	0,014	-7,86 $\pm$ 0,51	0,0137-0,0142	0,912 $\pm$ 0,14	10

#### 4. DISKUSSION OCH SLUTSATSER

En av de viktigaste uppgifterna för nikotinreceptorerna är deras förmåga att reglera frisättning av neurotransmittorer i CNS (Picciotto m.fl. 2001; Dani 2015). Frisättningen av noradrenalin till följd av stimulering av nikotinreceptorer har kunnat undersökas med flera olika metoder. I denna avhandling granskades forskning som undersökt noradrenalinfrisättning med isolerade hjärnskivor, mikrodialys och synaptosomer (Leslie m.fl. 2002; Azam och McIntosh 2006;

Chefer m.fl. 2009; Evans 2015). Dessa olika metoder har bidragit med värdefull information om det noradrenerga systemet och frisättning av noradrenalin. I denna avhandling togs noradrenalinfrisättning till följd av stimulering av nikotinreceptorer upp. Dessa forskningsmetoder har även gett insikt om nikotinreceptorernas stökiometri, deras distribution och deras potentiella roll i patofysiologiska mekanismer relaterade till olika sjukdomar i CNS. Noradrenalinfrisättning till följd av stimulering av nikotinreceptorer har främst undersökts i hippocampus, hjärnbarken (flera olika delar) och i delar av de limbiska regionerna.

Hippocampus innerveras av de noradrenerga neuronerna som projicerar från LC (Azam och McIntosh 2006). Distribution av de olika nikotinreceptor-underenheterna i hippocampus har också kunnat undersökas m.h.a. de metoderna som nämnts i tidigare stycke. Detta har kunnat undersökas med synaptosomer och genom att använda antagonister för att blockera specifika nikotinreceptorer, har man kunnat dra slutsatser om vilka nikotinreceptorer som finns i det undersökta området. I hippocampus har man kunnat konstatera att i stort sätt alla nikotinreceptorer som förmedlar noradrenalinfrisättning har en  $\beta 2$ -underenhet. Dessutom har  $\alpha 4$ - och  $\alpha 6$ -underenheten konstaterats ha en viktig roll som förmedlare av noradrenalinfrisättning i hippocampus. Blockering av  $\beta 3$ -underenheten ledde också till nästintill total inhibering av noradrenalinfrisättning. Samma resultat har också kunnat observerats i andra undersökningar (Azam och McIntosh 2006; Scholze m.fl. 2007). Både  $\alpha 4$ - och  $\alpha 6$ -underenheterna brukar förkomma tillsammans med  $\beta 2$ -underenheten i nikotinreceptorer. Baserat på resultaten från de olika undersökningarna kan man anta att de viktigaste nikotinreceptorer som förmedlar noradrenalinfrisättning i hippocampus är  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer.

Posadas m.fl. (2013) rapporterade också om dessa receptorer i sin översiktsartikel där man samlat information från flera olika forskningar som bl.a. fokuserat på nikotinreceptorernas distribution i CNS. Eftersom hippocampus reglerar minnesfunktioner och genomgår patofysiologiska förändringar i bl.a. Alzheimers sjukdom, är detta ett område som med hjälp av de olika forskningsmetoderna kunde undersökas för att klarlägga nikotinreceptorernas funktion i detta område (Posadas m.fl. 2013; Dineley m.fl. 2015). Försämring av de kognitiva funktionerna hos individer som lider av Alzheimers sjukdom kan kopplas till förändringar i hippocampus. Detta indikerar att nikotinreceptorerna i hippocampus kan vara potentiella målreceptorer för behandling av försämrade kognitiva funktioner. För att kunna utveckla mera specifika läkemedel krävs dock mera forskning för att fastställa nikotinreceptorernas

stökiometri i hippocampus och för att ytterligare kunna fastställa om  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorerna även förekommer tillsammans med andra nikotinreceptor-underenheter i hippocampus. Ett problem med nikotinagonister har varit att de inte är tillräckligt specifika (Hurst m.fl. 2013).

Noradrenalinfrisättning i hjärnbarken och i de olika delarna av hjärnbarken har undersökts med flera olika metoder (Woo m.fl. 2002). Amtage m.fl. 2004; Salminen och Vaha (opublicerat material). Patofysiologiska förändringar i hjärnbarken är kopplade till flera olika sjukdomar (Dineley m.fl. 2015). Försämring av kognitiva funktioner i neurodegenerativa sjukdomar och neurologiska sjukdomar (t.ex. schizofreni), som kopplats till patofysiologiska förändringar i hjärnbarken har delvis bidragit till hjärnbarkens popularitet bland forskare. Nikotinreceptorernas förmedling av noradrenalinfrisättning i hjärnbarken har kunnat undersökas med hjärnskivor, mikrodialys och synaptosomer (Toth m.fl. 1992; Anderson m.fl. 2000; Leslie m.fl. 2002; Salminen och Vaha, opublicerat material). Alla dessa metoder har bidragit med viktig information om noradrenerg signalering i hjärnbarken och dess betydelse för kognitiva funktioner. Dessa undersökningar har visat att noradrenalin frisätts i bl.a. neocortex, prefrontala cortex och motoriska barken.

Resultat från den opublicerade forskningen som utförts av Salminen och Vaha (opublicerat material) har också gett insikt i vilka receptorunderenheter som förmedlar noradrenalinfrisättningen i motoriska- och prefrontala cortex hos möss. Resultaten visade att noradrenalinfrisättningen i prefrontala cortex är större än i den motoriska barken, men i båda fallen kunde man observera noradrenalinfrisättning. Resultaten som erhöles efter administrering av  $\alpha$ -CTX-MII, visade att  $\alpha$ -CTX-MII-känslig frisättning åtminstone minskade till viss del efter blockering med  $\alpha$ -CTX-MII i både motoriska- och prefrontala cortex. Den  $\alpha$ -CTX-MII-resistenta frisättningen av noradrenalin var dock högre än den  $\alpha$ -CTX-MII-känsliga frisättningen. Även de homomeriska  $\alpha 7$ -receptorerna har hittats i hjärnbarken hos gnagare och frisättning till följd av stimulering av dessa receptorer kan inte helt uteslutas (Pohanka 2012). Genom att använda  $\alpha 7$ -receptorspecifika antagonister kunde man undersöka om noradrenalinfrisättning också förmedlas via dessa receptorer i prefrontala- och motoriska barken. Resultaten från denna undersökning visar dock att den viktigaste förmedlaren av noradrenalinfrisättning i både prefrontala- och motoriska barken är  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorer. Både  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ - presynaptiska receptorer har kopplats till flera olika sjukdomar (Dineley

m.fl. 2015). Patofysiologiska förändringar som kopplats ihop med Alzheimer sjukdom, har även kunnat kopplas till  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorer i hjärnbarken och hippocampus. Jämfört med friska individer i samma ålder, har man kunnat observera att  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorernas bindningsställen i hippocampus och hjärnbarken minskar med ca 50 %, medan muskarina receptorer inte påverkas i större utsträckning. Med andra ord verkar nikotinreceptorerna påverkas i högra grad. Agonister för  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorerna, som potentiellt skulle kunna öka noradrenerg transmission i hjärnbarken, kunde med andra ord utgöra intressanta målreceptorer för behandling av kognitiva symptom som associeras med Alzheimers sjukdom. Även  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorerna, som även tycks förmedla en del av noradrenalinfrisättningen i hjärnbarken kunde vara en potentiell målreceptor för nya nikotinreceptor-specifika läkemedel eftersom även de receptorerna tycks förmedla noradrenalinfrisättning i både prefrontala- och motoriska hjärnbarken. Hittills har forskning fokuserat mycket på de nikotinreceptorerna som förekommer i stora koncentrationer i CNS, men resultat från forskning pekar även på att nikotinreceptorer som inte förekommer i samma utsträckning besitter potential (t.ex.  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer).

Noradrenalinfrisättning till följd av stimulering av nikotinreceptorer har också undersökts i hypotalamus och amygdala, som är viktiga strukturer i hjärnans limbiska regioner (Yoshida m.fl. 1980; Anderson m.fl. 2000; Amtage m.fl. 2004). Även i dessa områden verkar  $\alpha 4\beta 2^*$ -receptorerna ha en viktig roll för frisättningen av noradrenalin. Noradrenalinfrisättningen i dessa limbiska strukturer har inte undersökts i lika stor utsträckning som t.ex. hippocampus och hjärnbarken. Mera information om nikotinreceptormedierad frisättning i de limbiska områden, kunde eventuellt leda till nya insikter om nikotinreceptorernas roll i dessa regioner. Patofysiologiska förändringar i de limbiska områden har kunnat observeras i både neurologiska och neurodegenerativa sjukdomar (Anderson m.fl. 2000; Espay m.fl. 2014). Mera forskning inom detta område kunde bidra med värdefull information som bl.a. kunde utnyttjas inom läkemedelsforskningen.

Andra neurodegenerativa sjukdomar som kopplats till  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer är bl.a. Parkinsons sjukdom. (Quik och Wonnacott 2011). De motoriska symptomen som kopplas till Parkinsons sjukdom, kunde potentiellt också behandlas genom att öka noradrenerg transmission i motoriska barken med  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptoragonister. Båda receptorerna finns även i dopaminerga banor i hjärnan och är strakt kopplade till Parkinsons sjukdom. Noradrenerg denervering kan bl.a. observeras i hjärnbarken och hippocampus i hjärnan vid Parkinsons sjukdom. Agonister för  $\alpha 4\beta 2^*$ - och  $\alpha 6\beta 2^*$ -receptorer, kunde ha potential att lindra



på bl.a. motoriska symptom genom att binda till målreceptorer i den motoriska barken, och dessutom kunde de även eventuellt lindra kognitiva symptom som associeras med Parkinsons sjukdom (Quik och Wonnacott 2011; Salminen och Vaha (opublicerat material)). Trots att det finns bevis på att dessa receptorer kunde vara potentiella målreceptorer, krävs det dock mera forskning för att kunna fastställa dessa teorier och för att ytterligare studera stökiometrin av dessa nikotinreceptorer.

Intressant nog har man kunnat undersöka noradrenalinfrisättningen i hjärnbarken med mänskliga vävnadsprover (Woo m.fl. 2002; Amtage m.fl. 2004). Resultat från dessa undersökningar har också visat att noradrenalin frisätts från den mänskliga hjärnbarken till följd av stimulering av nikotinreceptorer. I undersökningen utförd av Woo m.fl. (2002) kunde man se att en betydligt större mängd noradrenalin frisattes i den mänskliga hjärnbarken jämfört med undersökningar som använt råttor (Anderson m.fl. 2000). Det kan finnas flera förklaringar till detta fenomen och en orsak är självklart skillnader mellan arter. Det finns möjlighet att de nikotinreceptorer i den mänskliga hjärnbarken som förmedlar noradrenalinfrisättning inte är de samma som förmedlar noradrenalinfrisättning i hjärnbarken hos råttor. Metoderna som användes i de olika undersökningarna var inte heller identiska, vilket också kan påverka resultaten. Det bör också nämnas att vävnadsproverna från den mänskliga hjärnbarken erhöles från individer med svårbehandlad och läkemedelsresistent epilepsi. Det finns en möjlighet att de patofysiologiska förändringarna i hjärnan och långvarig behandling med olika läkemedel hade lett till förändringar i hjärnbarken hos epilepsipatienterna, vilket också kan ha påverkat resultaten. Detta visar att skillnader mellan olika däggdjur bör också tas i beaktande i forskning. Det finns ett behov av att genomföra undersökningar med vävnadsprover från den mänskliga hjärnan, men detta är förstås mera kostsamt och tillgängligheten kan också vara ett problem.

Synaptosomer är en av de metoder som använts för att undersöka de olika neurotransmittersystemen i CNS (Raiteri och Raiteri 2000). Hittills har de främst använts för att undersöka frisättning av neurotransmittorer till följd av stimulering av presynaptiska receptorer. Frisättning av dopamin, noradrenalin och GABA har undersökts mycket med synaptosomer. Forskning med synaptosomer är en väldigt mångsidig metod och forskning med dem har också lett till identifiering av nikotinreceptor-underenheter i olika hjärnområden och hjälpt till att definiera stökiometrin för nikotinreceptorer. Detta är egenskaper med metoden som kunde utnyttjas ännu mera för att utveckla nya läkemedel som utövar sin verkan via nikotinreceptorer. Jämfört med forskning med hjärnskivor, frisätts det mindre

neurotransmittorer från synaptosomer (Anderson m.fl. 2000). Detta kan bero på att det finns flera olika receptorer i hjärnskivor som har förmågan att förmedla neurotransmittorfrisättning. Synaptosomer lämpar sig utmärkt för att undersöka frisättning av neurotransmittorer som förmedlas via presynaptiska receptorer. Detta gör dem till en utmärkt metod att undersöka de presynaptiska nikotinreceptorerna och deras funktion.

Ett av de mest centrala målen i denna avhandling var att karaktärisera dopaminfrisättningen i striatala synaptosomer till följd av stimulering av nikotinreceptorer med agonisterna acetylkolin och vareniklin. I båda fallen frisattes dopamin från de striatala synaptosomerna och effekten var koncentrationsberoende. Frisättningen av dopamin var mindre när vareniklin användes för att stimulera synaptosomerna än när acetylkolin användes. Detta var väntat eftersom vareniklin är en partiell agonist och acetylkolin är en full agonist för nikotinreceptorer (Hurst m.fl. 2013). Genom att använda  $\alpha$ -CTX-MII kunde dopaminfrisättningen delas upp i  $\alpha$ -CTX-MII-känslig och  $\alpha$ -CTX-MII-resistent frisättning. Eftersom  $\alpha$ -CTX MII blockerar  $\alpha6\beta2^*$ -receptorer, kan man dra slutsatsen att dopaminfrisättning i striatum förmedlas via  $\alpha6\beta2^*$ - och icke- $\alpha6\beta2^*$ -receptorer (Champtiaux m.fl. 2003; Salminen m.fl. 2004). Eftersom man känner till att  $\alpha4\beta2^*$ - och  $\alpha6\beta2^*$ -receptorer förmedlar dopaminfrisättningen i dopaminerga banor (i detta fall nigrostriatala banor), kunde man dra slutsatsen att den största delen av dopaminfrisättning som kunde observeras till följd av blockering av  $\alpha6\beta2^*$ -receptorer med  $\alpha$ -CTX-MII, högst antagligen förmedlas via  $\alpha4\beta2^*$ -receptorer. I denna undersökning testades inte andra antagonister, så man kan inte helt utesluta att en del av dopaminfrisättningen förmedlades via de presynaptiska  $\alpha7$ -receptorerna, som också påträffas i striatum (Posadas m.fl. 2013). Baserat på resultaten från undersökningen utförd av Whiteaker m.fl. (2000), kan man dock dra slutsatsen av att dopaminfrisättningen inte förmedlades via  $\alpha3$ -underenheten i de striatala synaptosomerna. Dopaminfrisättningen minskade inte märkvärt när synaptosomerna förbehandlades med  $\alpha$ -CTX-MII. Detta var också väntat eftersom vareniklin är en  $\alpha4\beta2^*$ -agonist och  $\alpha$ -CTX-MII blockerar  $\alpha6\beta2^*$ -receptorer. Resultaten från denna undersökning var förväntade. För att undersöka frisättningen till följd av stimulering av synaptosomerna med vareniklin användes flera försöksdjur (vareniklin: N = 10, acetylkolin N = 5). Detta gjordes för att få jämnare resultat. Det bör även nämnas att det förekommer individuella skillnader mellan mössen, som också kan påverka resultaten och höja värdena för bl.a. standardavvikelsen.

## 5. KÄLLFÖRTECKNING

Albuquerque EX, Pereira E, Castro NG, Alkondon M, Reinhardt S, Schröder H, Maelicke A: Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 757: 48-72, 1995

Amtage F, Neugebauer B, McIntosh JM, Freiman T, Zentner J, Feuerstein TJ, Jackish 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 [<sup>3</sup>H] norepinephrine from rat brain slices using a new 96-well format assay. *Neuropharmacology* 39: 2663-2672, 2000

Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppel E: Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med* 3: 24, 2010

Azam L, Maskos U, Changeux JP, 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

Azam L, McIntosh JM: Effect of novel  $\alpha$ -conotoxins on nicotine-stimulated [<sup>3</sup>H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 231-237, 2004

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

Benarroch EE: The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology* 73: 1699-1704, 2009

Breese CR, Adams C, Logel J, Drebing C, Rollins Y, Barnhart M, Sullivan B, Demasters BK, Freedman R, Leonard S: Comparison of the regional expression of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  mRNA and [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -bungarotoxin binding in human postmortem brain. *J Comp Neurol* 27: 385-398, 1997

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

Chefer VI, Thompson AC, Shippenberg TS: Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci* 47: 1-35, 2009

Clarke PB, Pert A: Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons. *Brain Res* 348: 355-358, 1985

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

Dani JA: Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine. *Int Rev Neurobiol* 124: 3-19, 2015

Dineley KT, Pandya AA, Yakel JL: Nicotinic ACh-receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 36: 96-108, 2015

Egan TM, North RA: Actions of acetylcholine and nicotine on rat locus coeruleus neurons in vitro. *Neuroscience* 19: 565-571, 1986

Espay AJ, LeWitt PA, Kaufmann H: Norepinephrine deficiency in parkinson's disease: The case for noradrenergic enhancement. *J Mov Disord* 29: 1710-1719, 2014

Evans GJO: The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. *Cold Spring Hard Protoc* 1: 421-424, 2015

Fergusson DM, Horwood LJ, Lynskey MT: Maternal smoking before and after pregnancy: effects on behavioral outcomes in middle childhood. *Pediatrics* 92: 815-822, 1993

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

Fung SC, Fillenz M: The actions of barbiturates on release of noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes. *Neuropharmacology* 23: 1113-1116, 1984

Gallardo KA, Leslie FM: Nicotine-stimulated release of [<sup>3</sup>H] norepinephrine from fetal rat locus coeruleus cells in culture. *J Neurochem* 70: 663-670, 1998

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

Hall GH, Turner DM: Effects of nicotine on the release of <sup>3</sup>H-noradrenaline from the hypothalamus. *Biochem Pharmacol* 21: 1829-1838, 1972

Hebb CO, Whittaker VP: Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *J Physiol* 142: 187-196, 1958

Hurst R, Rollema H, Bertrand D: Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther* 137: 22-54, 2013

Jhou JF, Tai HC: The study of postmortem human synaptosomes for understanding alzheimer's disease and other neurological disorders: a review. *Neurol Ther* 6: 57-68, 2017

Kulak JM, Nguyen TA, Olivera BM, and McIntosh JM: alpha-Conotoxin MII blocks nicotine-stimulated dopamine release in rat striatal synaptosomes. *J Neurosci* 17: 5263-5270, 1997

- Leslie FM, Gallardo KA, Park MK: Nicotinic acetylcholine receptor-mediated release [<sup>3</sup>H] norepinephrine from developing and adult rat hippocampus: direct and indirect mechanisms. *Neuropharmacology* 42: 653-661, 2002
- Luo S, Kulak JM, Cartier GE, Jacobsen RE, Yoshikami D, Oliver 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
- Marks MJ, Grady SR, Salminen O, Paley MA, Wageman CR, McIntosh JM, Whiteaker P: alpha 6 beta 2\*-subtype nicotinic acetylcholine receptors are more sensitive than alpha 4 beta 2\*-subtype receptors to regulation by chronic nicotine administration. *J Neurochem* 130: 185-198, 2014
- 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
- McKee SA, Weinberger AH, Harrison ELR, Coppola S, George TP: Effects of the nicotinic receptor antagonist mecamylamine on ad-lib smoking behavior, topography, and nicotine levels in smokers with and without schizophrenia: a preliminary study. *Schizophr Res* 155: 317-324, 2009
- Naeff B, Schlumpf M, Lichtensteiger W: Pre- and postnatal development of high affinity [<sup>3</sup>H] nicotine binding sites in rat brain regions: an autoradiographic study. *Dev Brain Res* 68: 163-174, 1992
- Ochoa ELM, Chattopadhyay A, McNamee, MG: Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol Neurobiol* 9: 141-178, 1989
- O'Leary KT, Leslie FM: Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptor-mediated [<sup>3</sup>H]norepinephrine release from rat cerebellum. *J Neurochem* 84:952-959, 2003
- Mitchell SN: Role of the locus coeruleus in the noradrenergic response to a systemic administration of nicotine. *Neuropharmacology* 32: 937-949, 1993
- Picciotto MR, Caldarone BJ, Brunzell DH, Zachariou V, Stevens TR, King SL: Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacol Ther* 92: 89-102, 2001
- Pohanka M: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int J Mol Sci* 13: 2219-2238, 2012
- Posadas I, López-Hernández B, Ceña V: Nicotinic receptors in neurodegenerative disorders. *Curr Neuropharmacol* 11: 298-314, 2013
- Quik M, Wonnacott S:  $\alpha 6\beta 2^*$  and  $\alpha 4\beta 2^*$  nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for parkinson's disease. *Pharmacol Rev* 63: 938-966, 2011

- Raiter L, Raiteri M: Synaptosomes still viable after 25 years of superfusion. *Neurochem Res* 25: 1265-1274, 2000
- Rapier C, Lunt GG, Wonnacott S: Nicotinic modulation of [<sup>3</sup>H]dopamine release from striatal synaptosomes: pharmacological characterisation. *J Neurochem* 54: 937-945, 1990
- Rolls ET: The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. *Brain Struct Funct* 224: 3001-3018, 2019
- 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
- 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, Drapeau JA, McIntosh JM, Collins AC, Marks J, 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
- Scholze P, Orr-Urtreger A, Changeux JP, McIntosh JM, Huck S: Catecholamine overflow from mouse and rat brain slice preparations evoked by nicotinic acetylcholine receptor activation and electrical field stimulation. *Br J Pharmacol* 151: 414–422, 2007
- Singewald N, Philippu A: Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog Neurobiol* 56: 237-267, 1998
- 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
- Westfall TC: Effect of nicotine and other drugs on the release of <sup>3</sup>H-norepinephrine and <sup>3</sup>H-dopamine from rat brain slices. *Neuropharmacology* 13: 693-700, 1974
- 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, McIntosh JM, Luo S, Collins AC, Marks MJ: 125I- $\alpha$ -conotoxin MII identifies a novel nicotinic acetylcholine receptor population in mouse brain. *Mol Pharmacol*. 57: 913–925, 2000
- Whittaker VP, Michaelson IA, Jeanette R, Kirkland A: The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles: ('synaptosomes'). *Biochem J* 90: 293-303, 1964
- Woo RS, Park EY, Shin MS, Jeong MS, Zhao RJ, Shin BS, Kim CJ, Park JW, Kim KW: Mechanism of nicotine-evoked release of [<sup>3</sup>H]-noradrenalin in human cerebral cortex slices. *Br J Pharmacol* 137: 1063-1070, 2002

Yoshida K, Kato Y, Imura H: Nicotine-induced noradrenalin release from hypothalamic synaptosomes. *Brain Res* 162: 361-368, 1980