

## P r a c e p r z e g l ą d o w e

**Paweł Krząścik**

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Akademii Medycznej  
w Warszawie

# WPŁYW TLENKU AZOTU NA OŚRODKOWY UKŁAD NERWOWY: INTERAKCJE Z ALKOHOLEM ETYLOWYM

Do niedawna nie przypuszczano, że tlenek azotu (NO) jeden z najprostszych związków chemicznych powszechnie występujących w naszym środowisku, odgrywa ogromną rolę w regulowaniu wielu funkcji życiowych nie tylko bakterii, ale i kręgowców wyższych, w tym ssaków.

U ludzi NO powstaje z L-argininy pod wpływem dioksygenaz zwanych syntazami tlenku azotu (NOS). Wśród izoform tego enzymu rozróżniamy dwie funkcjonalnie odmienne formy: konstytutywną (cNOS) oraz indukowalną (iNOS) [4].

Konstytutywna forma syntazy tlenku azotu jest aktywowana przez wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia, co może być wynikiem stymulacji receptorów kininowych (np. dla bradykininy) lub receptorów glutaminergicznych typu NMDA. Tak zaktywowana cNOS natychmiast wytwarza pikomolarne ilości NO, który aktywując cyklazę guanylową zwiększa stężenie cGMP w komórce. Obecnie uważa się, że ten nietrwały związek (okres biologicznego półtrwania NO wynosi 6 sekund) wytworzony w wyniku stymulacji cNOS jest odpowiedzialny za utrzymywanie homeostazy w układzie krążenia, usprawnia funkcjonowanie układu immunologicznego, adaptuje żołądek do zmian objętości, wywołuje erekcję prącia [23]. Istnieje wiele dowodów, że NO odgrywa także ważną rolę w czynności ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.) [15].

Indukowalna forma NOS nie występuje w komórce pozostającej w spoczynku. iNOS jest syntetyzowana pod wpływem takich patogenów jak endotoksyna *E.Coli* lub cytotoksyny (np. interleukiny). Synteza tego enzymu jest hamowana przez glikokortykosterydy np. hydrokortyzon i deksametazon, nie jest jednak regulowana przez jony  $Ca^{2+}$ . Wytworzona iNOS syntetyzuje znaczne, działające toksycznie ilości NO. Należy zauważyć, że w organizmie NO nie występuje pod postacią gazu,

lecz jako wolny rodnik NO, anion nitrozylowy NO<sup>-</sup> lub kation nitrosoniowy NO<sup>+</sup>. Te wysoce reaktywne chemicznie związki odpowiedzialne są za obserwowaną po stymulacji iNOS denaturację białka, kwasów nukleinowych i lipidów. Przypuszcza się, że aktywacja iNOS jest odpowiedzialna za onkogenezę oraz powstawanie wstrząsu endotoksycznego [23].

Odkrycie NO w organizmach ssaków pozwoliło na wyjaśnienie wielu procesów fizjologicznych w szczególności związanych z czynnością układu sercowo-naczyniowego, a także przyczyniło się do odkrycia mechanizmu działania wielu leków, w tym znanej od ponad 100 lat nitrogliceryny będącej donorem grupy NO. Jakkolwiek istnieje szereg doniesień o obwodowym działaniu NO to jego rola w funkcjonowaniu o.u.n. jest bardzo mało poznana.

W o.u.n. syntaza tlenu azotu występuje tylko w neuronach a nie zaobserwowano jej w gleju. Jest aktywowana przez pobudzenie receptorów NMDA, cholecystokiny (CCK) i napływ jonów Ca<sup>2+</sup> do komórki [5, 6, 10].

W chwili obecnej wiadomo, że L-arginina (prekursor NO) zwiększa pozakomórkowe stężenie dopaminy (DA) i jej metabolitów [22]. Wyniki uzyskane przez wielu badaczy wskazują, że mechanizm powyższego działania jest bardzo złożony. Zaobserwowano, że NO hamuje wychwyt zwrotny (uptake) DA [24] a także indukuje zależne od jonów Ca<sup>2+</sup> uwalnianie DA w prądkowiu. Efekt ten hamowany jest przez hemoglobinę - związek wychwytyjący NO [21]. Zaobserwowano też, że uwolnienie DA w prądkowiu spowodowane stymulacją receptora NMDA jest realizowane poprzez zwiększoną syntezę NO a hamowane przez inhibitory NOS [18]. Interakcja NO z DA nie jest jednak w pełni wyjaśniona. Wykazano bowiem, że stężenie DA w prądkowiu spada po podaniu NO w postaci gazu, a wzrasta jeśli jako dawcę NO zastosujemy nitroprusydek sodu [16]. W dostępnym piśmiennictwie brak doniesień odnośnie interakcji pomiędzy NO a poszczególnymi subtypami receptora DA oraz lekami hamującymi lub pobudzającymi układ dopaminergiczny.

Jeszcze mniej poznana jest zależność pomiędzy układem serotonergicznym a NO. Zaobserwowano, że w prądkowiu L-arginina zwiększa stężenie pozakomórkowe serotoniny (5-HT) [16, 22]. Wydaje się prawdopodobne, że mechanizm tego zjawiska jest związany z hamowaniem wychwytu zwrotnego 5-HT przez NO, gdyż w synaptosomach jądra półleżącego przegrody (*Nucleus accumbens*) NO hamuje wychwyt 5-HT [24].

NO zwiększa także stężenie pozakomórkowe kwasu glutaminowego (Glu) i hamuje jego wychwyt w synaptosomach [16, 24].

Po podaniu L-argininy obserwowano też wzrost pozakomórkowego stężenia kwasu asparaginowego (Asp), kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), tauryny i acetylcholinoliny (ACH) w prądkowiu [16].

Istnieje bardzo niewiele prac potwierdzających behawioralne efekty działania NO. Wiemy, że związek ten może mieć istotne znaczenie w procesach plastyczności układu nerwowego a w szczególności w powstawaniu tzw. „pamięci świeżej” [9].

Podanie inhibitora NOS wywołuje działanie anksjolityczne u szczurów [17, 29]. Sugeruje się, że efekt ten związany jest z interakcją pomiędzy NO a receptorami

NMDA i CCK-B, jednakże trudno w tej chwili stwierdzić, czy patologiczny wzrost aktywności NOS prowadzący do zwiększenia stężenia NO w neuronach może być przyczyną występowania lęku. Hipotezę tę mogłaby potwierdzać obserwacja, że u ludzi którym podano nitroprusydek sodu występuje niepokój, natomiast u osób zażywających nitroglicerynę obserwuje się nieznaczne uspokojenie, co może wiązać się z zahamowaniem aktywności cNOS (aktywność cNOS jest hamowana przez zwiększone stężenie NO [26]). Tę pozorną sprzeczność działania dwóch donorów NO można tłumaczyć tym, że nitroprusydek sodu jest podawany w sposób ciągły (wlew) w bardzo dużych dawkach i uwalnia NO w sposób bezpośredni, co gwarantuje osiągnięcie odpowiednich „anksjogennych” stężeń w o.u.n. Natomiast nitrogliceryna uwalnia NO w sposób pośredni i w porównaniu do nitroprusydku jest podawana w mniejszych dawkach, co może powodować, że ilość uwolnionego NO jest za mała aby wywołać niepokój, a na tyle duża, aby zahamować czynność cNOS.

Innym interesującym doniesieniem jest praca wskazująca na rolę NO w pobieraniu płynów (popędzie picia) [8]. Autorzy wykazali, że L-Arg hamuje pragnienie u szczurów, których uprzednio pozbawiono dostępu do wody, a także u tych, którym podano angiotensynę II. W przypadku pobierania pokarmu wykazano efekty wręcz przeciwne: inhibitor NOS hamował popęd głodu, a podanie L-Arg odwracało to działanie [27]. Ci sami autorzy wykazali, że głodzenie powoduje wzrost aktywności NOS.

Ostatnio pojawiło się sporo informacji na temat interakcji NO z alkoholem etylowym (EtOH) i opioidami. Już w latach siedemdziesiątych zaobserwowano, że podtlenek azotu ( $N_2O$ ) zmniejsza objawy abstynencji alkoholowej, opioidowej i nikotynowej u ludzi [11, 12], wywołuje analgezję znoszoną przez nalokson i naltrekson a także zaobserwowano, że tolerancja na morfinę hamuje analgetyczne działanie  $N_2O$  [3].

Wraz z odkryciem endogennego NO powyższe doniesienia o interakcji  $N_2O$  z EtOH nabrały nowego znaczenia i były impulsem do dalszych badań mających na celu wyjaśnienie interakcji pomiędzy NO a EtOH.

Obecnie wiadomo, że EtOH wpływa na syntezę NO: podawany przewlekłe stymuluje jego wytwarzanie, natomiast podany jednorazowo hamuje aktywność NOS [28] i obniża stężenie NO [13, 25]. Informacje te pozostają w ścisłym związku z doniesieniami informującymi, że przewlekłe podawanie EtOH powoduje wzrost ilości i gęstości receptorów NMDA i kanałów  $Ca^{2+}$  [20], natomiast pojedyncze przyjęcie EtOH wywołuje efekt przeciwny. Można zatem przypuszczać, że obserwowane zmiany stężenia NO są ściśle powiązane ze zmianami funkcji receptorów NMDA i kanałów  $Ca^{2+}$ . Pojawiła się także praca, która udowadnia, że wzrost stężenia NO spowodowany jest zwiększeniem ilości mRNA dla cNOS w mechanizmie „upregulacji” genu odpowiedzialnego za transkrypcję tego mRNA [14].

Z powyższymi informacjami zgodne są wyniki badań wpływu NO na rozwój tolerancji i alkoholowy zespół abstynencyjny. Inhibitory NOS nasilają działanie i toksyczność pojedynczej dawki EtOH [1]. Ponadto inhibitory NOS hamują rozwój tolerancji na EtOH [19] czyli mogą blokować wytwarzanie NO, który powstaje w wyniku długotrwałego podawania alkoholu etylowego. Jest zatem prawdopodobne,

że zwiększone stężenie NO jest przyczyną lub jedną z przyczyn powstawania tolerancji na EtOH. W tym świetle bardzo interesująco przedstawia się doniesienie wskazujące, że inhibitory NOS hamują objawy zespołu abstynencyjnego po odstawieniu alkoholu etylowego, natomiast dawcy NO nasilają ten zespół [2]. Wiemy, że w zespole abstynencyjnym dochodzi do zwiększonego uwalniania większości neuroprzekazników, między innymi DA oraz wzrostu liczby receptorów NMDA i kanałów  $Ca^{2+}$ . NO nasila uwalnianie DA, Asp i Glu, co jak zostało udowodnione, nasila zespół abstynencyjny. Zablockowanie syntezy NO prowadzi do spadku aktywności DA i receptorów NMDA a więc hamuje zespół abstynencyjny.

Wieloletnie obserwacje kliniczne wskazują, że u ludzi zatrutych alkoholem etylowym leki będące donorami NO nasilają efekty toksyczne alkoholu.

Z drugiej strony wspomniana uprzednio praca dowodzi, że inhibitory NOS nasilają toksyczne i letalne efekty działania pojedynczej dawki EtOH [1]. Wydaje mi się, że pomiędzy tymi doniesieniami nie występuje ewidentna sprzeczność, gdyż w obu przypadkach dochodzi do nasilenia wpływu EtOH na syntezę NO.

U ludzi na ogół mamy do czynienia z wieloletnim pićm EtOH co prowadzi do zwiększonej produkcji NO. Stwierdzenie to może być pośrednio potwierdzone obserwacją, że u osób pijących w sposób umiarkowany ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca jest mniejsze niż u niepijących [7] - a więc uwalniający się NO może działać ochronnie.

Biorąc pod uwagę powyżej przytoczone fakty należy rozważyć możliwość wykorzystania donorów NO w farmakoterapii uzależnienia od EtOH. Można domniemywać, że podanie osobom uzależnionym od alkoholu etylowego donora NO może prowadzić do:

1. Nasilenia działania EtOH w mechanizmie zwiększenia oddziaływania NO. Efekt ten będzie występował w pierwszej fazie podawania leku.

2. W późniejszym okresie dojdzie do zahamowania syntezy NO w mechanizmie zwrotnego hamowania aktywności cNOS, co będzie prowadziło do zahamowania rozwoju tolerancji na EtOH. Można też oczekiwać, że zahamowanie aktywności cNOS doprowadzi do zmniejszenia reaktywności neuronów DA i glutaminergicznych, a co w konsekwencji doprowadzi do ograniczenia toksycznych działań EtOH i ograniczy jego spożycie.

Nasilenie przez wielokrotnie spożywany EtOH syntezy NO może mieć również aspekty negatywne biorąc pod uwagę neurotoksyczne [20] i cytotoksyczne działania wysokich stężeń NO np. w patogenezie alkoholowego uszkodzenia wątroby [30]. Może to mieć znaczenie w sytuacji, gdy podanie donora lub prekursora NO nasili toksyczne efekty równocześnie przyjmowanego EtOH. Potrzebne są zatem dalsze badania laboratoryjne mające na celu wyjaśnienie interakcji pomiędzy EtOH a NO.

## PIŚMIENNICTWO

1. Adams M.L., Meyer E.R., Sewing B.N. and Cicero T.J.: *Effect of nitric oxide-related agents on alcohol narcosis*. Alcohol Clin. Exp. Res. 18, 969-975, 1994.

2. Adams M.L., Sewing B.N., Meyer E.R. and Cicero T.J.: *Nitric oxide-related agents alter alcohol withdrawal in male rats*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 19, 195-199, 1995.
3. Berkowitz B.A., Ngai S.H. and Finck A.D.: *Nitrous oxide analgesia: resemblance to opiate action*. Science 194, 967-968, 1976.
4. Brecht D.S. and Snyder S.H.: *Nitric oxide, a novel neuronal messenger*. Neuron 8, 3-11, 1992.
5. Brecht D.S. and Snyder S.H.: *Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP level in the cerebellum*. Pro. Natl. Acad. Sci. 86, 9030-9033, 1986.
6. Brecht D.S. and Snyder S.H.: *Isolation of nitric oxide synthetase, a a calmodulin-requiring enzyme*. Pro. Natl. Acad. Sci. 87, 682-685, 1990.
7. Bruhwyler J., Chleide E., Liegeois F. and Carreer F.: *Nitric Oxide: a new messengre in the brain*. Neur. Biobeh. Rev. 17, 373-384, 1993.
8. Calapai G., Squadrito F., Altavilla D., Zingarelli B., Campo G.M., Cilia M. and Caputi A.P.: *Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour*. Neuropharm. 31, 761-764, 1992.
9. Chapman P.F., Atkins C.M., Allen M.T., Haley J.E., Steinmetz J.E.: *Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning*. Neuroreport. 3, 567-570, 1992.
10. Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.M.J. and Moncada S.: *NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices*. Eur. J. Pharm. Mol. Pharm. Ssi. 172, 413-416, 1989.
11. Gillman M. and Lichtigfeld F.J.: *Analgesic nitrous oxide for alcohol withdrawal: a critical appraisal after 10 years use*. Postgrad. Med. J. 66, 543-546, 1990.
12. Gillman M. and Lichtigfeld F.J.: *Opioid properties of psychotropic analgesic nitrous oxide (laughing gas)*. Persp. Biol. Med. 38, 125-138, 1994.
13. Grenberg S., Kolls J., Malinski T., Xie J.: *Ethanol decreases mRNA for nitric oxide synthaze II in alveolar macrophages stimulated with interferon gamma and endotoxin*. Alcohol 11, 539-547, 1994.
14. Greenberg S.S., Xie J., Wang Y., malinski T., Summer W.R. and McDonough K.: *Escherichia coli-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation and gene expression and release of nitric oxide is attenuated by chronic alcohol ingestion*. Alcohol. 11, 53-60, 1994.
15. Gronbeak M., Deis A., Sorensen T., Becker U., Schnohr P., Jensen G.: *Mortality associated with moderate intake of wine, beer or spirits*. Br. Med. J. 310, 1165-1169, 1995.
16. Guevara-Guzman R., Emson P.C. and Kendrick K.M.: *Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP*. J.Neurochem. 62, 807-810, 1994.
17. Guimaraes F.S., De Aguiar J.C., DelBel E.A. and Ballejo G.: *Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey*. Neuroreport. 5, 1929-1932, 1994.
18. Hanbauer I., Wink D., Osawa Y., Edelman G.M., Gally J.A.: *Role of nitric oxide in NMDA-evoked release [3H]-dopamine from striatal slices*. Neuroreport. 3, 409-12, 1992.
19. Khanna J.M., Morato G.S., Shah G., Chau A., Kalant H.: *Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol*. Brain. Res. Bull. 32, 43-47, 1993.
20. Lancaster F.E.: *Alcohol, nitric oxide and neurotoxicity: is there a conection ?* Alcohol Clin. Exp. Res. 16, 539-541, 1992.

21. Lonart G., Cassels K.L. and Johnson K.M.: *Nitric oxide induces calcium-dependent [<sup>3</sup>H]dopamine release from striatal slices*. J. Neurosci. Res. 35, 192-198, 1993.
22. Lorrain D.S. and Hull E.M.: *Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area*. Neuro Report 5, 87-89, 1993.
23. Moncada S., Palmer R.M.J. and Higgs E.A.: *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharm. Rev. 43, 109-142, 1991.
24. Pogun S., Baumann M.H., Kuhar M.J.: *Nitric oxide inhibits [<sup>3</sup>H]dopamine uptake*. Brain Res. 641, 83-91, 1994.
25. Persson M.G. and Gustafsson L.E.: *Ethanol can inhibit nitric oxide production*. Eur. J. Pharmacol. 224, 99-100, 1992.
26. Rengasamy A. and Johns R.A.: *Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide*. Mol. Pharmacol. 44, 124-128, 1993.
27. Squadrito F., Calapai G., Altavilla D., Cucinotta D., Zingarelli B., Campo G.M., Arcoraci V., Sautebin L., Mazzaglia G. and Caputi A.P.: *Food deprivation increases brain nitric oxide synthase and depresses brain serotonin levels in rats*. Neuropharm. 33, 83-86, 1994.
28. Tepperman B.L. Vozzolo B.L. and Soper B.D.: *Effect of neutropenia on gastric mucosal integrity and mucosal nitric oxide synthesis in the rat*. Dig. Dis. Sci.38, 2056-2061, 1993.
29. Volke V., Koks S., Vasar E., Bourin M., Bradwejn J. and Mannisto P.T.: *Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze*. Neuroreport 6, 1285-1288, 1995.
30. Wang Ji-Feng, Greenberg S. and Spitzer J.J.: *Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with or without pretreatment by lipopolysaccharide*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 19, 387-393, 1995.