

# **I RECETTORI CANALE: IL RECETTORE NICOTINICO PER L'ACETILCOLINA E IL RECETTORE-CANALE PER IL GABA**

## **ASPETTI GENERALI SULL'ORGANIZZAZIONE MOLECOLARE, SUL MODO DI FUNZIONARE E SULLA MODULAZIONE FARMACOLOGICA DEI RECETTORI CANALE**

I recettori-canale sono proteine multimeriche (fatte da più subunità) che attraversano da parte a parte la membrana plasmatica

Le subunità, allineate come bacchette, formano un canale attraverso cui possono passare ioni

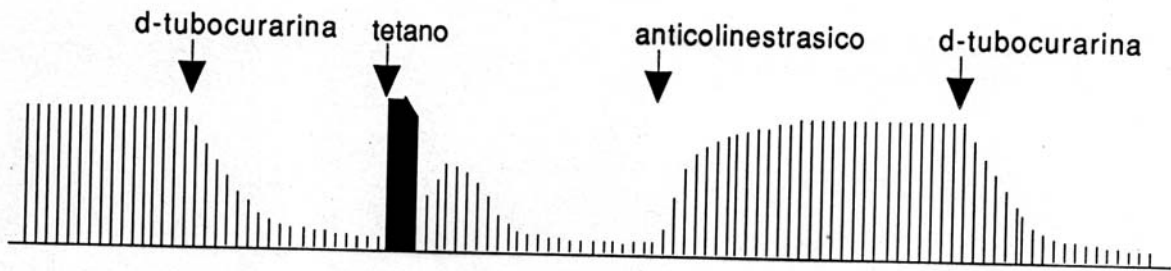
L'apertura del canale è stimolata dal legame dell'agonista al recettore canale

I recettori-canale si dividono in base alla carica che lasciano passare in:

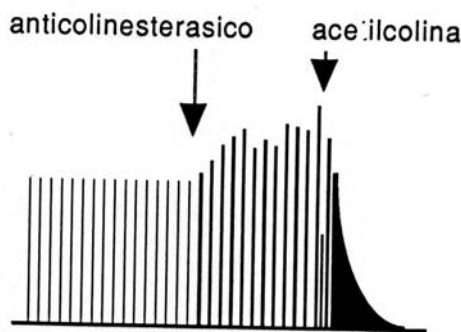
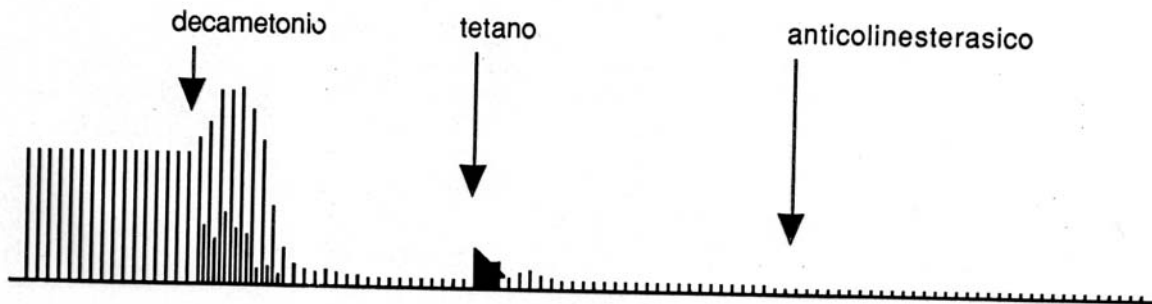
- 1- cationici (fanno passare cariche positive come sodio e calcio; esempi: recettore per l'acetilcolina, recettori per il glutammato, recettori per purine, ecc)
- 2- anionici (fanno passare cariche negative come cloro; esempi: recettore per il GABA, ecc)

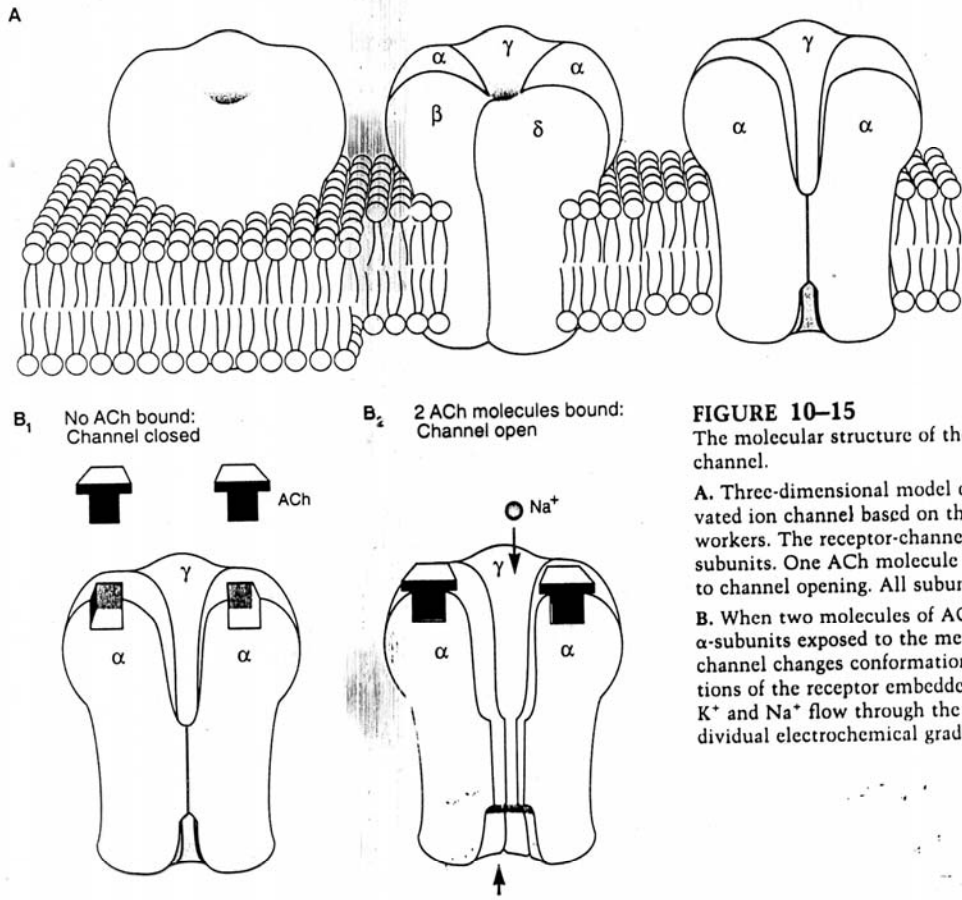
La stimolazione prolungata dei recettori canale provoca nel giro di pochi secondi desensitizzazione (incapacità del recettore a rispondere al neurotrasmettitore)

La desensitizzazione del recettore nicotinic è alla base di alcuni farmaci paralizzanti (detti depolarizzanti) utilizzati in anestesia



Descrivi accuratamente le variazioni di trasmissione sinaptica e formula delle ipotesi sul meccanismo d'azione. Nel grafico successivo viene provato un farmaco per te nuovo; decametonio: classificato come curaro in quanto il suo effetto finale è di inibire la trasmissione neuromuscolare. Tuo compito è di formulare un'ipotesi sul suo meccanismo d'azione. A tal proposito, dovrebbe esserti d'aiuto l'ultimo esperimento (anticolinestrasico + acetilcolina)

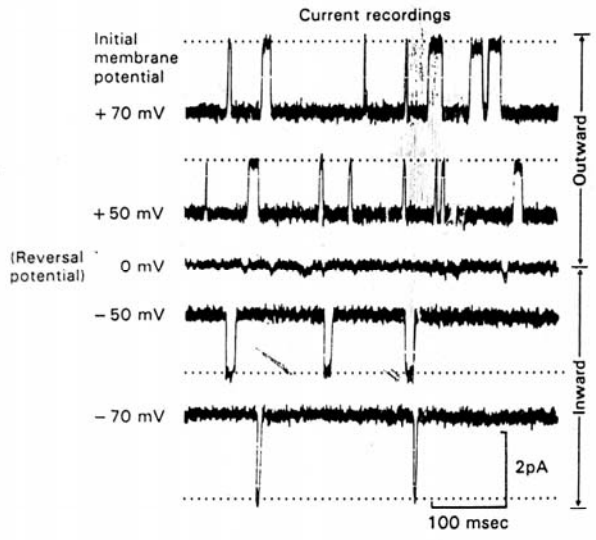




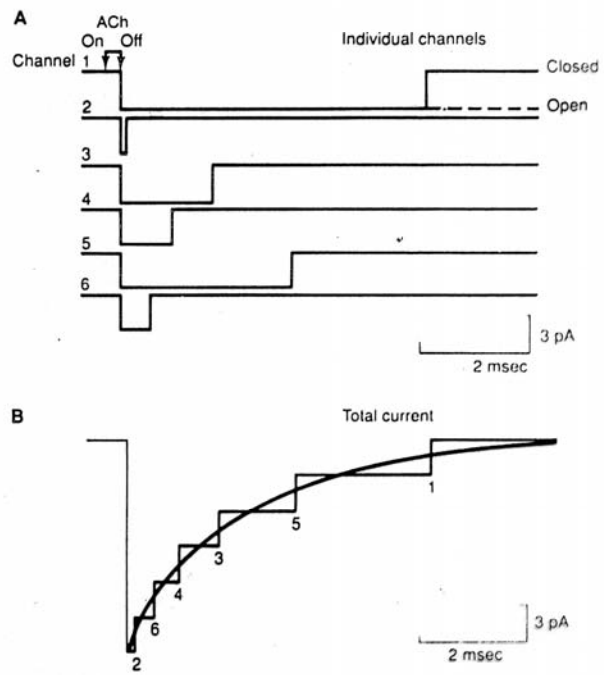
**FIGURE 10-15**  
The molecular structure of the ACh-activated receptor-channel.

**A.** Three-dimensional model of the nicotinic ACh-activated ion channel based on the model of Karlin and co-workers. The receptor-channel complex consists of several subunits. One ACh molecule binds to each  $\alpha$ -subunit prior to channel opening. All subunits contribute to the pore.

**B.** When two molecules of ACh bind to the portions of the  $\alpha$ -subunits exposed to the membrane surface, the receptor channel changes conformation, opening a pore in the portions of the receptor embedded in the lipid bilayer. Both  $K^+$  and  $Na^+$  flow through the open channel down their individual electrochemical gradients.



**FIGURE 10-12**  
A single-channel current has the same reversal potential (0 mV) as does the total end-plate current. The voltage across the patch of membrane where this recording was made was systematically varied prior to exposure to  $2 \mu M$  ACh. The current is inward below 0 mV and outward above 0 mV.



**FIGURE 10-13**  
The total end-plate current is the summed average of the cur-

Table 9-2

Comparison of Competitive (*d*-Tubocurarine) and Depolarizing (Decamethonium) Blocking Agents\*

	<i>d</i> -TUBOCURARINE	DECAMETHONIUM (ClO)
Effect of tubocurarine chloride administered previously	Additive	Antagonistic
Effect of decamethonium administered previously	No effect, or antagonistic	Some tachyphylaxis; but may be additive
Effect on block of anticholinesterase agents	Reversal of block	No antagonism
Effect on motor end-plate	Elevated threshold to acetylcholine; no depolarization	Partial, persisting depolarization
Initial excitatory effect on striated muscle	None	Transient fasciculations
Character of muscle response to indirect tetanic stimulation during <i>partial</i> block	Poorly sustained contraction	Well-sustained contraction
Effect on block of KCl or of a tetanus	Transient reversal of block	No antagonism
Effect of current applied to end-plate region:		
—cathodal	Lessens paralysis	Intensifies paralysis
—anodal	Intensifies paralysis	Lessens paralysis
Effect on denervated mammalian muscle	Transient fibrillation	Contracture

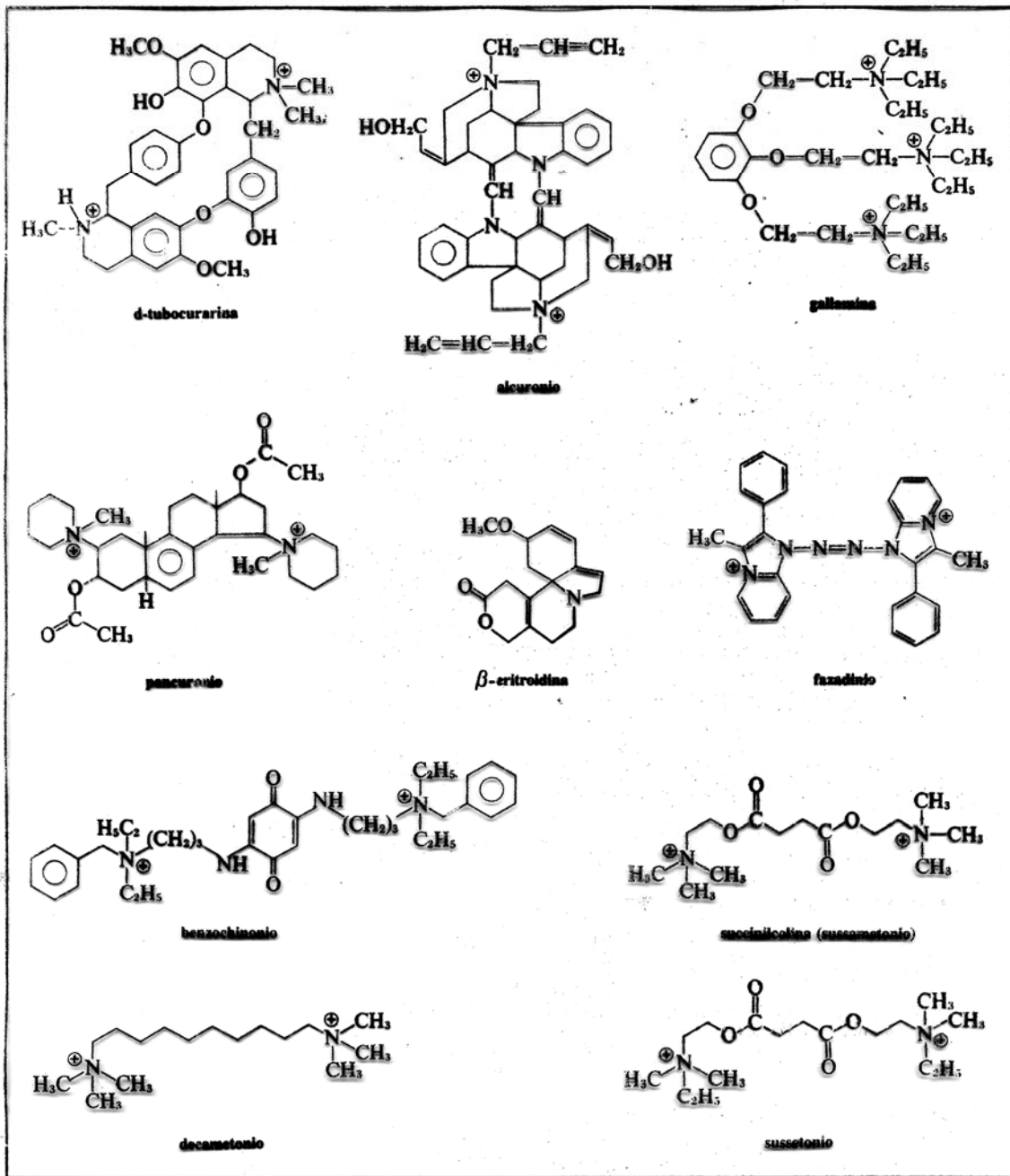
\*Based on data in Paton and Zaimis, 1952; Zaimis, 1976.

Table 9-1

## Classification of Neuromuscular Blocking Agents

AGENT	CHEMICAL CLASS	PHARMACOLOGICAL PROPERTIES	TIME OF ONSET, min	DURATION, min	MODE OF ELIMINATION
Succinylcholine (ANECTINE, others)	Dicholine ester	Ultrashort duration; depolarizing	1-1.5	6-8	Hydrolysis by plasma cholinesterases
<i>d</i> -Tubocurarine	Natural alkaloid (cyclic benzylisoquinoline)	Long duration; competitive	4-6	80-120	Renal elimination; liver clearance
Atracurium (TRACRIUM)	Benzylisoquinoline	Intermediate duration; competitive	2-4	30-40	Hofmann degradation; hydrolysis by plasma cholinesterases
Doxacurium (NUROMAX)	Benzylisoquinoline	Long duration; competitive	4-6	90-120	Renal elimination; liver metabolism and clearance
Mivacurium (MIVACRON)	Benzylisoquinoline	Short duration; competitive	2-4	12-18	Hydrolysis by plasma cholinesterases
Pancuronium (PAVULON)	Ammonio steroid	Long duration; competitive	4-6	120-180	Renal elimination; liver metabolism and clearance
Pipecuronium (ARDUAN)	Ammonio steroid	Long duration; competitive	2-4	80-100	Renal elimination; liver metabolism and clearance
Rocuronium (ZEMURON)	Ammonio steroid	Intermediate duration; competitive	1-2	30-40	Liver metabolism; renal elimination
Vecuronium (NORCURON)	Ammonio steroid	Intermediate duration; competitive	2-4	30-40	Liver metabolism and clearance; renal elimination

TAB. I - FORMULA DI STRUTTURA DI ALCUNI CURARI



Estratto da

**I RECETTORI-CANALE**

Cecilia Gotti e Francesco Clementi

CNR Centro Farmacologia Cellulare e Molecolare e Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Università degli Studi di Milano

Da: Farmacologia Generale e Molecolare, di Clementi e Fumagalli, UTET

# 6

## I RECETTORI-CANALE

Cecilia Gotti e Francesco Clementi

I recettori-canale sono canali ionici la cui apertura è modulata dall'interazione con specifici trasmettitori endogeni. A seguito del legame, il recettore cambia transitoriamente di conformazione aprendo in tal modo un canale transmembranario intrinseco nella sua struttura. Gli ioni, spinti dal gradiente elettrochimico, passano attraverso il canale e determinano una variazione del potenziale elettrico di membrana: ha così inizio la risposta cellulare alla attivazione del recettore.

A questa famiglia appartengono alcuni dei recettori per neurotrasmettitori classici ad ampia diffusione nel sistema nervoso centrale e periferico, come acetilcolina, GABA, glicina, aminoacidi eccitatori e serotonina, i recettori attivati dai nucleotidi ciclici cGMP e cAMP e i recettori dell'ATP. I recettori canale sono oligomeri formati da 3, 4 o 5 subunità e sulla base della presunta topologia delle subunità che li compongono, li possiamo suddividere in quattro classi:

1) Recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori nicotinici (recettori nicotinici muscolare e neuronale, recettore del GABA, della glicina e della serotonina).

2) Recettori ionotropici del glutammato (recettori NMDA, AMPA e Kainato).

3) Recettori aperti da nucleotidi ciclici (recettori cAMP e cGMP).

4) Recettori ionotropici dell'ATP P2X.

Sulla base della carica ionica che passa attraverso il canale aperto dall'interazione con il neurotrasmettitore, i recettori-canale possono indurre depolarizzazione o iperpolarizzazione (vedi Tab. 6.1) e mediare rispettivamente eventi eccitatori o inibitori

Il recettore di cui si hanno più informazioni sia sulla struttura che sulle caratteristiche biofisiche è quello nicotinico che costituisce il prototipo di questa famiglia recettoriale; per questo motivo la nostra descrizione verterà

soprattutto su di esso e verranno richiamate le differenze con gli altri recettori nei punti dove sarà necessario.

Tab. 6.1. Elenco dei recettori-canale e delle loro subunità clonate.

Sigla	Trasmettitore	Subunità clonate
<b>Recettori permeabili a cationi</b>		
<i>Recettore nicotinico muscolare e neuronale:</i>		
AChR	acetilcolina	$\alpha_{1-9}$ $\beta_{1-4}$ $\gamma$ $\delta$ $\epsilon$
<i>Recettori glutammatergici ionotropi:</i>		
AMPA	aminoacidi eccitatori	GluRA-D
KAR		GluR5-7
		KA1-2
NMDAR		NR1 NR2A-D
<i>Recettore serotoninergico:</i>		
5-HT <sub>3</sub>	serotonina	5-HT <sub>3A-B</sub>
<i>Recettore purinergico:</i>		
P2X	ATP e purine	P2X <sub>1-7</sub>
<i>Recettori aperti dai nucleotidi ciclici</i>		
CNG	cAMP e cGMP	$\alpha$ $\beta$
<b>Recettori permeabili ad anioni</b>		
<i>Recettore GABAergico:</i>		
GABA <sub>A</sub>	GABA	$\alpha_{1-6}$ $\beta_{1-4}$ $\gamma_{1-3}$ $\delta$ $\epsilon$ $\rho_{1-3}^*$
<i>Recettore glicinergico:</i>		
Gly-R	Glicina	$\alpha_{1-3}$ $\beta$

\* I recettori contenenti queste subunità sono, a volte, classificati come GABA<sub>C</sub>.

### Distribuzione tessutale e subcellulare dei recettori-canale

*Diversi recettori-canale sono localizzati a livello sinaptico*

Quasi tutti i tipi cellulari esprimono recettori-canale; tuttavia essi sono presenti in maggior quantità e varietà nelle cellule nervose. Gli organi elettrici di alcuni pesci esprimono una grande quantità di recettore nicotinico per l'acetilcolina (AChR) e si sono rivelati una fonte preziosa per la purificazione, l'analisi biochimica ed ultrastrutturale di questa molecola. Nei mammiferi, l'AChR è espresso nella giunzione neuromuscolare ad alta densità (10.000 molecole/ $\mu\text{m}^2$ ) all'apice delle pieghe della membrana postsinaptica. Questa posizione strategica (il recettore è situato proprio di fronte ai siti di rilascio del neurotrasmettitore) è fondamentale per l'efficienza della trasmissione sinaptica ed alterazioni del posizionamento delle molecole recettoriali, come si hanno nella Miastenia Grave, partecipano a creare il difetto di trasmissione sinaptica tipico di questa malattia.

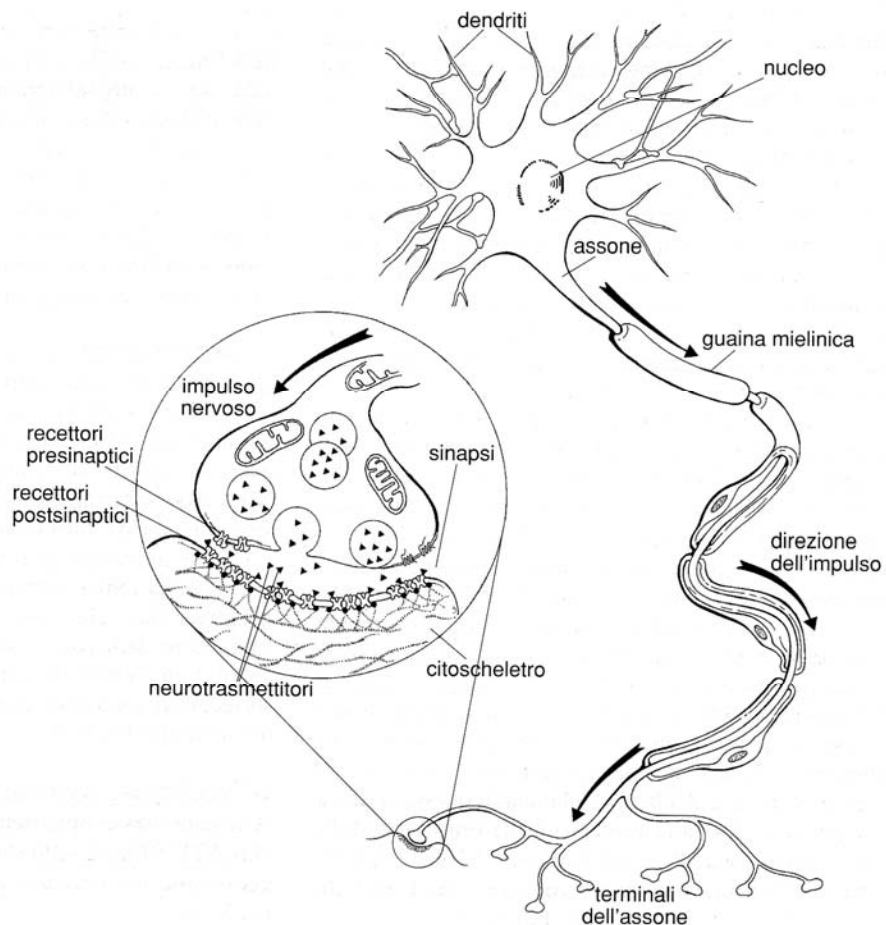
Dati meno accurati si hanno sulla distribuzione sub-cellulare degli altri recettori-canale, anche se per alcuni sottotipi di recettori della glicina e degli aminoacidi eccitatori è stata dimostrata una localizzazione preferenziale a livello delle densità postsinaptiche delle sinapsi interneuronali (funzionalmente corrispondenti ai tratti apicali della membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare). La precisa localizzazione e l'alta densità che si hanno in sede postsinaptica (sia nel muscolo che nel SNC) sono dovute alla presenza di proteine specifiche associate ai recettori che sono in grado di interagire con il citoscheletro sottostante la membrana postsinaptica (Fig. 6.1). È importante però notare che i recettori-canale possono essere presenti nella membrana plasmatica delle fibre muscolari scheletriche o del neurone anche in sedi extrasinaptiche; il ruolo svolto dai recettori in queste sedi non è ancora del tutto chiaro. Spesso, nei neuroni, i recettori-canale sono presenti sulla membrana presinaptica, dove fungono da modulatori del rilascio di neurotrasmettitori e svolgono quindi una funzione importante nella regola-

**Fig. 6.1.** È schematizzato un neurone, con il quale prendono contatto assoni provenienti da altre cellule nervose.

Nell'insero, ingrandito, un contatto sinaptico.

Nella presinapsi sono presenti le vescicole di neurotrasmettitore che secernono il loro contenuto nella chiave sinaptica. I recettori sono presenti sia nella parte postsinaptica, dove regolano la risposta cellulare all'impulso nervoso, che nella parte presinaptica dove modulano la secrezione del neurotrasmettitore. Per esempio in una giunzione colinergica, i recettori presinaptici possono riconoscere l'acetilcolina secreta ed in questo caso servono come meccanismo di autocontrollo della funzionalità della terminazione; oppure possono riconoscere neurotrasmettitori secreti da terminazioni vicine: per esempio in una giunzione colinergica vi possono essere recettori  $\alpha$ -adrenergici; in questo caso essi modulano la secrezione della sinapsi colinergica quando sono attivati da catecolamine rilasciate da una terminazione vicina; si ha così un controllo eterologo della funzionalità di una terminazione.

I recettori sono mantenuti nella posizione strategica nella membrana cellulare attraverso un legame con le strutture del citoscheletro.



zione dell'attività della sinapsi. Nel muscolo, la presenza di AChR in sede extrasinaptica è negativamente controllata dall'innervazione: il recettore extragiunzionale è infatti espresso dal muscolo embrionale o denervato e non da quello innervato.

## ORGANIZZAZIONE MOLECOLARE DEI RECETTORI-CANALE

### Quattro classi di recettori

I recettori canali sono proteine oligomeriche transmembranarie formati da 3, 4 o 5 subunità, con un singolo piano di simmetria rotazionale perpendicolare al piano della membrana dove sono inseriti. Sulla base della putativa o accertata topologia delle subunità che li costituiscono questi recettori sono stati classificati in quattro classi.

#### 1) RECETTORI APPARTENENTI ALLA FAMIGLIA DEI RECETTORI NICOTINICI

Il recettore nicotinic per l'acetilcolina presente nei muscoli di mammifero o negli organi elettrici di pesci è il prototipo di questa classe di recettori ed è un eteropentamero costituito da 4 subunità diverse presenti con un preciso rapporto stechiometrico di  $2\alpha_1$ ,  $1\beta_1$ ,  $1\epsilon$  (o, in alternativa,  $1\gamma$ ),  $1\delta$ .

A questa classe appartengono sia i recettori nicotini muscolari che neuronali, i recettori del GABA, ( $GABA_A$ ) della glicina (Gly-R) e della serotonina (5-HT<sub>3</sub>). Questa classe è caratterizzata dalla presenza, nella prima metà della regione N terminale extracellulare di ciascuna subunità, di un'ansa di 13 aminoacidi compresa tra due cisteine (corrispondenti alle Cys 128 e 142 della subunità  $\alpha_1$  del recettore nicotinic muscolare) che formano un ponte disolfuro importante per la struttura terziaria della subunità (Fig. 6.2A)

Studi di immunolocalizzazione, mutagenesi e di espressione in ovociti, indicano che ciascuna delle subunità dei recettori appartenenti a questa classe è formata da un unico filamento di aminoacidi caratterizzato da un terminale aminico extracellulare, che inizia un lungo dominio idrofilico di circa 200 amino-acidi, al quale seguono quattro segmenti idrofobici (M1, M2, M3, M4) connessi tra loro da brevi anse. La proteina attraversa la membrana plasmatica quattro volte a livello dei quattro domini idrofobici. Tra i segmenti M3 ed M4 è presente un lungo tratto di sequenza intracellulare e dopo il quarto segmento transmembrana (M4), vi è una breve coda extracellulare conclusa dal terminale carbossilico (Fig. 6.2B). Le subunità di questa classe di recettori hanno un alto grado di omologia della sequenza aminoacidica (compresa tra il 20 ed il 60%) e una simile distribuzione dei segmenti idrofobici che attraversano la membrana (vedi Fig. 6.2A).

I recettori-canale di questa classe sono formati da 5 subunità proteiche e benché esperimenti di ricostruzione in vitro o in oociti abbiamo dimostrato la possibilità che alcuni di questi recettori-canale possano essere formati da complessi di subunità identiche (omoligomeri), nella gran maggioranza dei casi essi sono eteropentameri costituiti da due o più diversi tipi di subunità.

Studi di microscopia elettronica ad alta risoluzione condotti sul recettore nicotinic della torpedine, (l'unico che si presta a tale studio) hanno dimostrato che le 5 subunità si affiancano tra loro a cerchio in modo da formare il poro ionico in un ordine ben preciso ( $\alpha_1$ - $\gamma$ - $\alpha_1$ - $\delta_1$ - $\beta_1$ ) (Figg. 6.2C, 6.3 e 6.4).



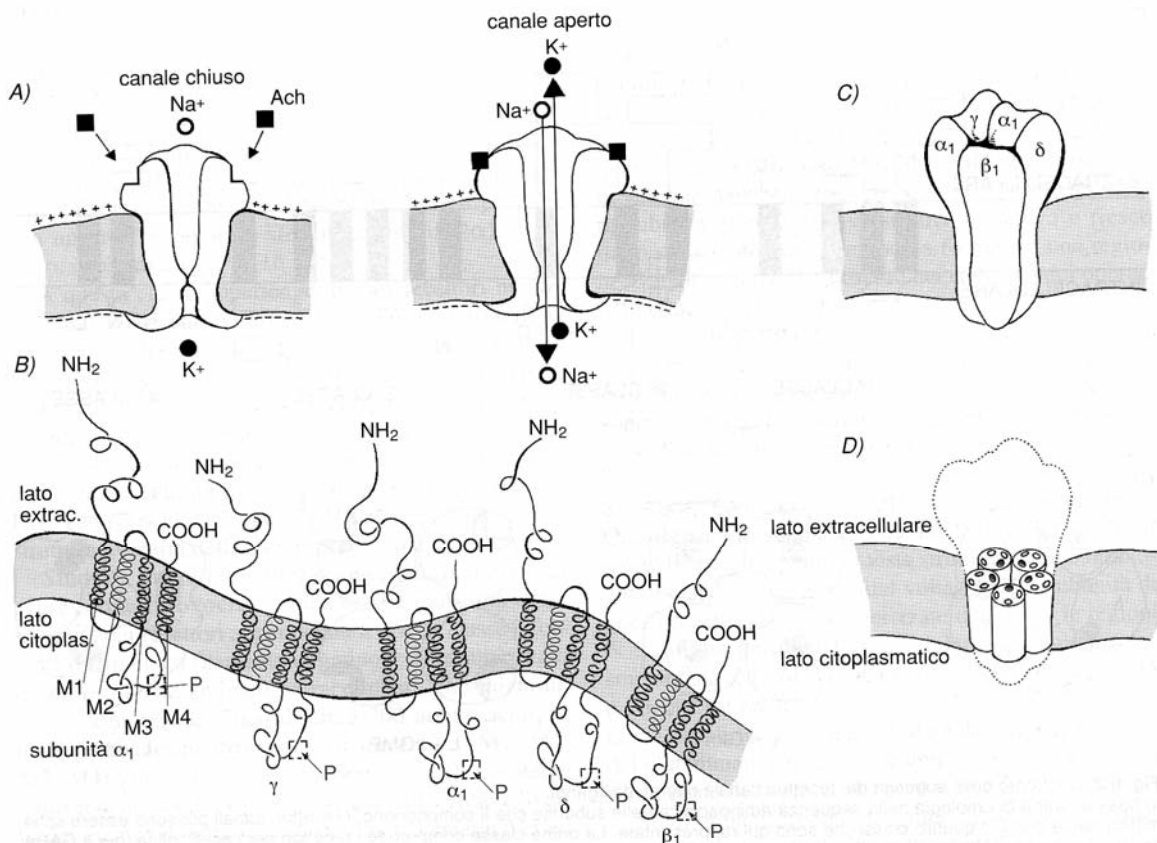
*I recettori-canale sono complessi macromolecolari che attraversano la membrana cellulare*

Del recettore nicotino per l'acetilcolina è stato possibile ottenere una dettagliata ricostruzione topo-

grafica che ha permesso di conoscere l'organizzazione molecolare di un recettore-canale.

La figura 6.3 mostra, in forma schematica, la struttura del recettore nicotino, con le 5 subunità glicoproteiche, che costituiscono nel loro insieme un complesso con peso molecolare di circa 300 kDa. I dati ottenuti da Unwin con la microscopia elettronica ad alta risoluzione, mostrano che il recettore nicotino ha una parte extracellulare a forma di imbuto, che sporge nello spazio extracellulare per circa 6,5 nm ed ha un diametro interno di 2 nm (Fig. 6.4C). Sembra che l'imbuto abbia la funzione di concentrare gli ioni destinati a passare attraverso il canale. Nella porzione extracellulare del recettore è anche localizzato il sito (o i siti) di legame per il neurotrasmettitore.

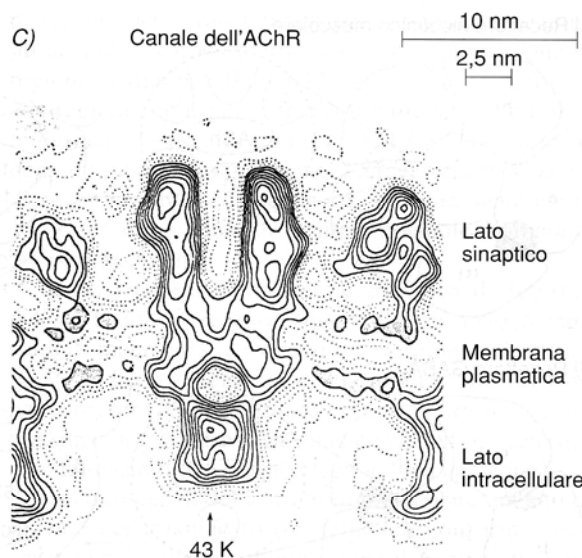
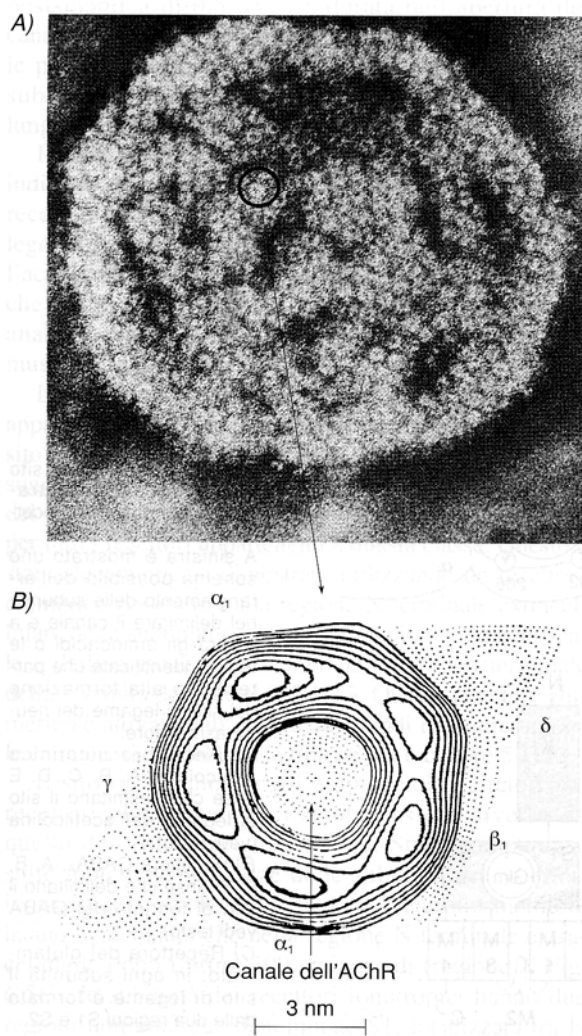
In corrispondenza dell'attraversamento della membrana plasmatica, il recettore si restringe; è questa la parte



**Fig. 6.3.** Schema dell'apertura del recettore nicotino dell'acetilcolina muscolare e della sua struttura molecolare.

A) In seguito al legame di due molecole di acetilcolina alle due subunità  $\alpha$  si ha una modificazione conformazionale del recettore con conseguente apertura del canale transmembranario intrinseco al recettore.  
 B) e C) Struttura pentamerica del recettore con ipotetica topologia delle cinque subunità che lo compongono. Le cinque subunità si associano e delimitano il canale. Ogni subunità è composta da una lunga porzione  $\text{NH}_2$ -terminale extracellulare e da quattro segmenti idrofobici (M1, M2, M3, M4). Sono inoltre indicati con P le regioni nel dominio intracellulare tra i segmenti M3 e M4 delle diverse subunità che contengono i siti di fosforilazione per le diverse chinasi.  
 D) Ipotetico arrangiamento delle cinque subunità ( $\alpha_1$ - $\gamma$ - $\alpha_1$ - $\delta$ - $\beta_1$ ) a formare il canale. Il canale è delimitato dai segmenti M2 (colorato) di ogni subunità.

critica per il funzionamento del recettore-canale: il poro selettivo per gli ioni. Esso è caratterizzato dalla presenza di aminoacidi carichi negativamente, disposti ad anello. La funzione di questi anelli sembra essere quella di selezionare e concentrare gli ioni attirando quelli per i quali il recettore è permeabile e respingendo gli altri in base alla loro carica: infatti essi sono di carica negativa in quei recettori-canale che sono permeabili ai cationi (es. recettori nicotinico, Fig. 6.6B), mentre sono non carichi in quelli permeabili ad anioni (es. Gly-R e GABA<sub>A</sub>). In questa regione è anche localizzata la "porta" d'ingresso per i cationi che è normalmente chiusa ma che, dopo l'interazione del recettore con l'ACh viene aperta e permette il passaggio dei cationi. Nella zona citoplasmatica, subito dopo il passaggio attraverso la membrana, il recettore si riallarga. Nelle porzioni citoplasmatiche della macromolecola sono presenti siti di fosforilazione (P) importanti per la regolazione della funzionalità del canale e siti di legame con le proteine del citoscheletro (Fig. 6.4).



**Fig. 6.4.** Il recettore dell'acetilcolina muscolare è presente in alta concentrazione sulle membrane postsinaptiche dell'organo elettrico di Torpedine.

A) Fotografia al microscopio elettronico di membrane, arricchite in recettori dell'acetilcolina, ottenute dall'organo elettrico di Torpedine, colorate con la tecnica del negative staining.

B) Immagine ricostruita al microscopio elettronico del recettore dell'acetilcolina visto dal lato sinaptico, presente nelle membrane in A. L'immagine è stata ottenuta mediante elaborazione da parte del computer delle immagini del recettore colorato con la tecnica del negative staining. Le cinque subunità si affiancano tra loro a cerchio in modo da formare il poro ionico in un ordine ben preciso  $\alpha_1$ - $\gamma$ - $\alpha_1$ - $\delta$ - $\beta_1$ .

C) Immagine ricostruita al microscopio elettronico del recettore visto in sezione come descritto in B. Si può osservare la lunga cavità extracellulare che forma l'imbuto nel quale vengono raccolti gli ioni che devono essere traslocati ed il restringimento del lume a livello della membrana plasmatica dove avviene la selezione ed il passaggio degli ioni. Al lato intracellulare del recettore è associata la proteina del citoscheletro 43K.

Le figure B e C sono prese da Unwin N., Nature 373:37-43, 1995.

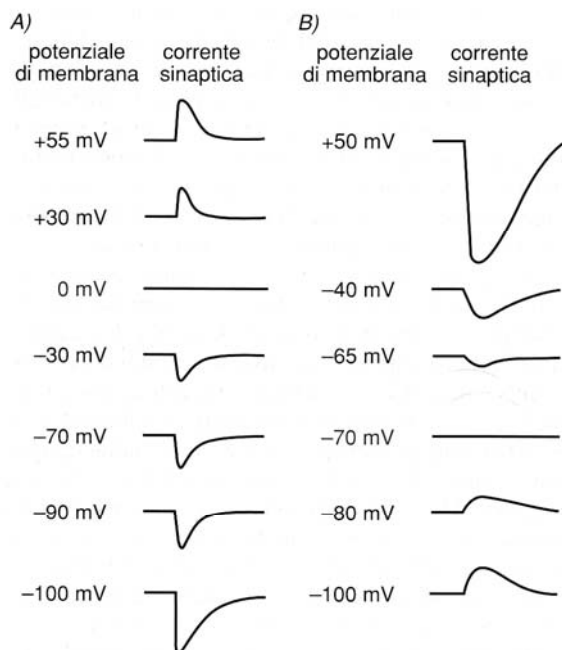
## **MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEI RECETTORI-CANALE**

L'entità della risposta cellulare indotta dai recettori-canale a seguito dell'interazione con l'agonista è modulabile da almeno due variabili: la differenza di potenziale transmembranario e la durata della stimolazione recettoriale.

*La direzione e l'entità delle correnti che passano attraverso i recettori-canali dipendono dal potenziale di membrana*

In genere il flusso di ioni attraverso i recettori-canale varia proporzionalmente con il potenziale di membrana: la relazione corrente/voltaggio è cioè lineare. Fanno eccezione i recettori per gli aminoacidi eccitatori del sottotipo sensibile ad NMDA: in questi l'apertura del canale richiede non solo l'occupazione dei siti di interazione con i neurotrasmettitori, ma anche una parziale depolarizzazione della membrana cellulare (vedi Cap. 30).

È importante ricordare che i recettori-canale sono caratterizzati da scarsa capacità di selezione della specie ionica permeante. Di conseguenza, attraverso il canale dell'AChR può entrare nella cellula il  $\text{Na}^+$  (e anche il  $\text{Ca}^{2+}$ ), ma anche uscire il  $\text{K}^+$ . A potenziali inferiori a quello di inversione dell'AChR (circa 0 mV) prevale l'influsso di  $\text{Na}^+$ , a potenziali maggiori prevale



**Fig. 6.7.** La direzione e l'entità delle correnti che passano attraverso i recettori canale dipendono dal potenziale di membrana.

A) Schema del variare della corrente sinaptica dopo attivazione dei recettori nicotinici da parte dell'acetilcolina. La variazione della corrente sinaptica è dovuta alla somma delle variazioni di corrente in ogni singolo canale. Il canale dell'AChR è ugualmente permeabile a  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  che si muovono quindi secondo il loro gradiente elettrochimico. Al potenziale di riposo di -90 mV l'attivazione dei recettori nicotinici da parte dell'acetilcolina dà luogo ad una corrente depolarizzante entrante dovuta all'ingresso degli ioni  $\text{Na}^+$ . A potenziali di membrana più positivi (-70, -30 mV) la corrente entrante portata dagli ioni  $\text{Na}^+$  diminuisce progressivamente e aumenta la corrente uscente di  $\text{K}^+$ . Questa porta ad una diminuzione della complessiva corrente sinaptica. Al potenziale di membrana di 0 mV in ogni singolo canale la corrente entrante di  $\text{Na}^+$  è bilanciata da una pari corrente uscente di  $\text{K}^+$  e quindi la corrente sinaptica risultante è uguale a 0. A potenziali più positivi prevale l'uscita di  $\text{K}^+$  e quindi la direzione della corrente sinaptica è invertita.

B) Schema del variare delle correnti al  $\text{Cl}^-$  al variare del potenziale di membrana. Al potenziale di membrana di -65 mV, in seguito all'attivazione dei recettori canali permeabili al  $\text{Cl}^-$  si ha una corrente iperpolarizzante entrante che aumenta in ampiezza se la cellula viene progressivamente depolarizzata (-40, +50 mV). Al potenziale di membrana di -70 mV che è uguale al potenziale di equilibrio del  $\text{Cl}^-$  non c'è nessuna corrente che attraversa il canale. A potenziali inferiori (tra -80 e -100 mV) si ha una corrente uscente depolarizzante che riporta il potenziale della cellula al potenziale di equilibrio del  $\text{Cl}^-$  di -70. La situazione può essere diversa in quelle cellule in cui il potenziale d'equilibrio del  $\text{Cl}^-$  è diverso da -70 mV.

l'efflusso di  $\text{K}^+$ . Quindi la stimolazione di un recettore-canale permeabile a cationi è virtualmente priva di effetti se la cellula è già depolarizzata ed ha un potenziale di membrana pari al potenziale di inversione del recettore (vedi Fig. 6.7). Nel caso di recettori-canali per anioni, l'influsso di cloro ( $\text{Cl}^-$ ) (unica specie ionica negativa permeante) si ha finché il potenziale è superiore a quello di equilibrio per lo ione (circa -70 mV); a potenziali inferiori (tra -80 e -100 mV) lo ione effluisce dalla cellula e riporta il potenziale di membrana al potenziale di equilibrio degli ioni  $\text{Cl}^-$  (Fig. 6.7). In qualunque caso l'attivazione di questi recettori si traduce in inibizione dell'attività sinaptica perché il potenziale di membrana viene mantenuto ad un valore ben distante da quello soglia (-55 mV).

#### *L'attivazione continua provoca desensitizzazione*

L'entità della risposta recettoriale è anche dipendente dalla durata della stimolazione: nel caso dell'AChR, il trattamento con agonisti non-idrolizzabili (es. succinilcolina) o con farmaci che bloccano la degradazione dell'acetilcolina (anticolinesterasici) comporta una stimolazione continua del recettore: in queste condizioni, ogni singola molecola di AChR fluttua rapidamente tra uno stato conduttivo ed uno non conduttivo per diverse centinaia di millisecondi, finché entra in uno stato non-conduttivo in cui non risponde più all'agonista; questo fenomeno è detto desensitizzazione. Nello stato desensitizzato il recettore lega l'acetilcolina con un'affinità circa 1000 volte superiore, ma rimane comunque non conduttivo.

La desensitizzazione è una proprietà intrinseca alla molecola del recettore; tuttavia, come abbiamo visto in uno dei paragrafi precedenti, la velocità con cui il processo di desensitizzazione si instaura e coinvolge tutte le molecole di recettore, è finemente regolato dalla cellula mediante fosforilazioni specifiche indotte da secondi messaggeri.

#### *Le proprietà ioniche e farmacologiche di un recettore-canale dipendono dalla sua composizione in subunità*

Già abbiamo visto come subunità di recettori per lo stesso neurotrasmettitore che differiscono tra loro in punti strategici della sequenza aminoacidica del territorio M2, conferiscano selettività ioniche specifiche al recettore-canale di cui fan parte. Anche proprietà quali conduttanza, tempo di apertura del canale, sensibilità alla desensitizzazione e capacità di legare agonisti ed antagonisti possono variare considerevolmente per uno stesso recettore in funzione del tipo di subunità che lo compone.

Un esempio tipico dell'importanza della composizione in subunità nel definire queste proprietà è costituito dal recettore nicotinic. Nel muscolo embrionale questo recettore è costituito dalle subunità  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (stechiometria: 2, 1, 1, 1) ed ha un tempo medio d'apertura relativamente lungo (4-11 msec) ma bassa conduttanza, mentre nell'adulto la subunità  $\gamma$  è rimpiazzata dalla subunità  $\epsilon$  ed il recettore ha un tempo di apertura breve (1-5 msec) ed alta conduttanza (vedi Fig. 6.8).

Nel SNC sono presenti isoforme diverse dell'AChR, che differiscono sia in termini di selettività

ionica, che di sensibilità agli agonisti e agli antagonisti. Il recettore nicotinic neuronale è un eteropentamero costituito da 2 subunità  $\alpha$  e 3 subunità  $\beta$ . Sono state identificate 8 subunità  $\alpha$  ( $\alpha_{2-9}$ ) e 3 subunità  $\beta$  ( $\beta_{2-4}$ ) diverse e specifiche per le cellule nervose. L'isoforma più diffusa nel SNC è il complesso recettoriale contenente le subunità  $\alpha_4$  e  $\beta_2$ , sensibile ad acetilcolina e nicotina, ma non bloccabile dalla  $\alpha$ -bungarotossina. Recentemente è stato dimostrato che nello stesso recettore con le subunità  $\alpha_4$  e  $\beta_2$  possono coesistere altre subunità, quali le subunità  $\alpha_2$  e  $\alpha_5$ , che ne modificano in parte le caratteristiche farmacologiche e funzionali. In diverse aree del SNC è espressa la subunità  $\alpha_7$ , che conferisce al recettore di cui fa parte sia la sensibilità alla  $\alpha$ -bungarotossina che una alta permeabilità allo ione calcio.

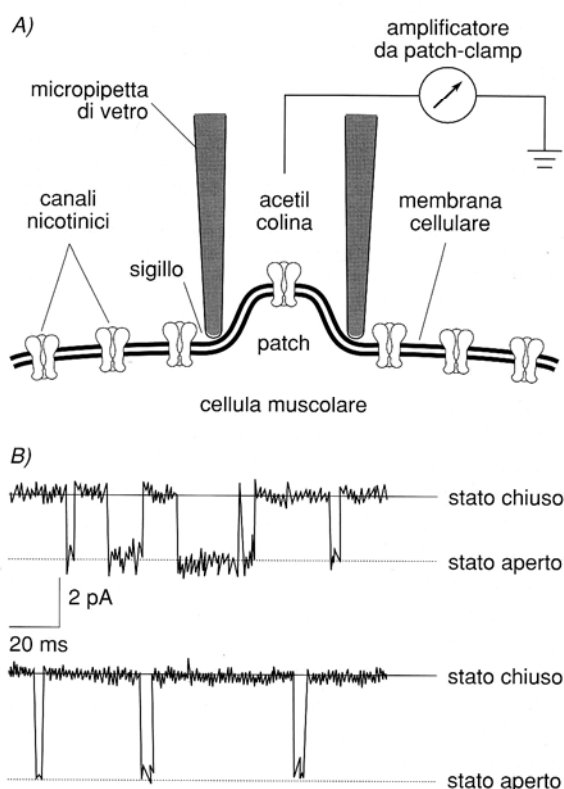
Un altro esempio è rappresentato Gly-R: nel midollo spinale, dove alta è la sensibilità alla stricnina, prevale il recettore contenente la subunità  $\alpha_1$ , mentre nelle aree più rostrali, dove la sensibilità alla stricnina è inferiore, sono maggiormente espresse le subunità  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ .

Un ulteriore esempio di modifica delle proprietà recettoriali dipendente dalla composizione in subunità è fornito dal recettore GABA<sub>A</sub>. Infatti in vitro bastano una subunità  $\alpha$  e una  $\beta$  per ottenere un recettore funzionante aperto dal legame del GABA alla subunità  $\beta$ ; ma nello stesso recettore, per ottenere la sensibilità alle benzodiazepine, che si legano alla subunità  $\alpha$ , è indispensabile la presenza della subunità  $\gamma$  che, allostericamente, modula il recettore e lo rende sensibile all'azione delle benzodiazepine.

I meccanismi cellulari e molecolari che controllano questa eterogeneità recettoriale non sono ancora chiari. La pluralità di recettori che si può ottenere con le combinazioni di diverse subunità, permette alla cellula di variare i parametri biologici importanti della funzionalità recettoriale, come la localizzazione subcellulare (diffusa o presinaptica o elevata nelle densità postsinaptiche), la velocità di desensitizzazione e le proprietà ioniche, che giocano un ruolo fondamentale nella formazione e nel mantenimento dei contatti sinaptici. Inoltre l'eterogeneità recettoriale può essere uno degli strumenti attraverso i quali le cellule nervose modulano l'eccitabilità e l'intensità delle risposte in funzione degli stimoli a cui sono esposte, fenomeni che sono alla base dei processi di apprendimento e memoria.

### Meccanismi d'azione dei farmaci che modulano l'attività dei recettori-canale

Farmaci capaci di competere con il neurotrasmettitore per il legame sul suo sito di interazione possono fungere da agonisti o antagonisti a seconda della loro capacità di indurre o meno la modificazione conformazionale



**Fig. 6.8.** Le proprietà funzionali del recettore nicotinic muscolare cambiano durante lo sviluppo.

A) Schema di un unità di patch clamp utilizzata per determinare le proprietà biofisiche del singolo canale dell'AChR. Una micropipetta di vetro con un diametro di  $1 \mu\text{M}$  è pressata contro la membrana di un muscolo scheletrico a cui è stato rimosso il tessuto connettivo. La micropipetta è riempita con una soluzione fisiologica e contiene un elettrodo di metallo che è connesso con uno speciale circuito elettrico che misura la corrente che fluisce attraverso la membrana sotto la punta della pipetta.

B) Sono riportati due esempi di conduttanza di singolo canale registrati in canali attivati dall'acetilcolina nel muscolo fetale o adulto. Nel muscolo fetale (traccia superiore) che esprime un recettore costituito dalle subunità  $\alpha\beta\gamma\delta$  il canale ha una minore conduttanza (40 pS) e un tempo di apertura lungo (11 msec). Nel muscolo adulto che esprime un recettore  $\alpha\beta\epsilon\delta$  (traccia inferiore) il canale ha una conduttanza maggiore (59 pS) ma un tempo di apertura minore (6,6 msec).

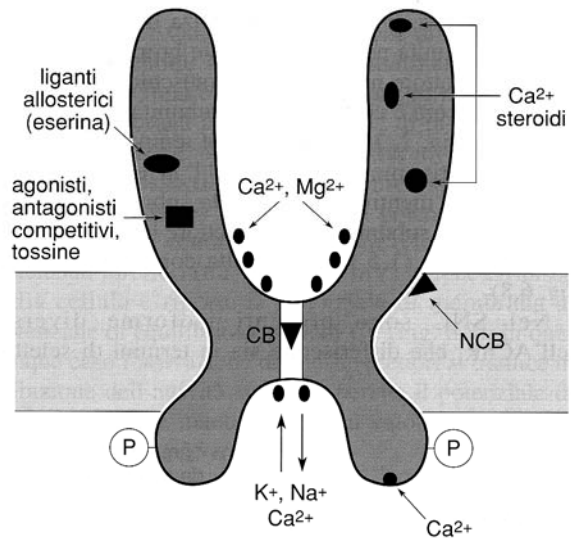
le necessaria per l'apertura del canale ionico intrinseco nella macromolecola recettoriale. In questo modo è possibile modulare l'intensità della risposta recettoriale e dei fenomeni biologici che ad essa seguono.

L'attività del recettore può essere modulata anche da farmaci che si legano in siti diversi da quelli del neurotrasmettitore, chiamati siti allosterici (Fig. 6.9). L'occupazione di questi siti può avere effetti non solo sulla cinetica di legame del neurotrasmettitore, ma anche su apertura e chiusura del canale ionico e sulla velocità del passaggio allo stato desensitizzato. Prendendo ad esempio il recettore GABA<sub>A</sub>, farmaci come le benzodiazepine modulano il legame del GABA sulla subunità  $\beta$  del recettore e il processo di apertura del canale è regolato da farmaci come gli steroidi, i barbiturici e la picrotossina; inoltre il canale allo stato aperto può essere occluso dalla penicillina e le benzodiazepine possono ridurre la velocità di entrata del recettore nello stato desensitizzato.

Nella figura 6.9 sono mostrati alcuni esempi di farmaci che si legano a siti allosterici, e che in questo modo modulano il recettore nicotinic.

Il significato fisiologico di questi siti allosterici non è noto ma è probabile che almeno alcuni di essi rappresentino dei siti di legame per sostanze endogene ancora sconosciute.

Alcuni dei farmaci attivi su siti allosterici diversi da quelli per i neurotrasmettitori possono essere importanti in terapia proprio in virtù del loro meccanismo d'azione (per esempio, barbiturici e benzodiazepine). Per altri, gli effetti possono essere considerati secondari ma non per questo meritevoli di minor attenzione. Per esempio molti ormoni corticosteroidi (il desametasone, il prednisolone, lo idrocortisone, ed il progesterone) inibiscono il recettore nicotinic muscolare in modo rilevante. Questo ha un risvolto anche nella prassi terapeutica quando si instauri una terapia immunosoppressiva con corticosteroidi in un paziente affetto da Miastenia Grave, una malattia autoimmune diretta contro l'AChR, caratterizzata da



**Fig. 6.9.** Rappresentazione schematica del sito di legame di agonisti, antagonisti e dei numerosi siti allosterici che modulano la funzionalità del recettore nicotinic. I siti allosterici che legano il  $\text{Ca}^{2+}$ , gli steroidi, l'eserina e i bloccanti non competitivi, sono distribuiti sulla parte esterna del canale, nel canale stesso, all'interfaccia con la membrana e nella parte citoplasmatica del recettore. P = sito di fosforilazione, CB = bloccanti del canale, NCB = bloccanti non competitivi.

una diminuzione del numero di recettori postsinaptici. È infatti necessario porre molta attenzione, soprattutto all'inizio della terapia, per non indurre episodi di paralisi dei muscoli respiratori dovuti al blocco da parte dei farmaci steroidei dei pochi recettori nicotini rimasti. Anche la eserina (Fig. 6.9), conosciuta come un potente inibitore delle colinesterasi, e talvolta usata nella terapia della Miastenia Grave può potenziare l'attività dell'AChR legandosi ad un sito allosterico: l'effetto di questo farmaco è quindi dato da due effetti sinergistici, il rallentamento della degradazione del neurotrasmettitore e l'attivazione diretta del recettore.

## **FARMACOLOGIA DEL RECETTORE NICOTINICO PER L'ACETILCOLINA**

Il recettore nicotinic per l'acetilcolina è concentrato sulla membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare

L'acetilcolina, liberata dal terminale presinaptico del motoneurone, attiva il recettore nicotinic; l'apertura del canale causa ingresso di cariche positive, depolarizzazione della membrana postsinaptica, generazione del potenziale d'azione e contrazione muscolare

Il recettore nicotinic muscolare è un eteropentamero fatto da 2 subunità alfa (a cui si lega l'acetilcolina, una subunità beta, una subunità delta e una subunità epsilon (nell'embrione o nel muscolo denervato è presente la subunità gamma al posto della subunità gamma).

Il recettore nicotinic è presente anche nel Sistema Nervoso Centrale ma differisce da quello muscolare per le subunità che lo compongono (solo subunità alfa e beta) e per la sensibilità ai farmaci

Nel SNC esistono 3 diverse subunità beta e 9 diverse subunità alfa che possono associarsi in combinazioni che sono specifiche per varie zone del SNC

I recettori nicotinici del SNC partecipano a modulare importanti funzioni come memoria e affettività

I farmaci attivi sul recettore nicotinic muscolare si distinguono in antagonisti competitivi (curari) e depolarizzanti

Entrambi i tipi di farmaci trovano applicazione in anestesia per indurre paralisi

I curari inducono paralisi flaccida in quanto semplici antagonisti competitivi

I depolarizzanti inducono paralisi spastica (attivano il recettore nicotinic) seguita da paralisi flaccida (sintomo della desensitizzazione)

## **FARMACOLOGIA DEL RECETTORE-CANALE PER IL GABA**

Il recettore-canale per il GABA (detto GABA<sub>A</sub>) conduce ioni cloro.

La sua attivazione causa riequilibrio delle concentrazioni del cloro lungo il gradiente elettrolitico che, nella maggior parte dei casi, comporta iperpolarizzazione e riduzione dell'eccitabilità della cellula nervosa

In alcune aree del SNC (midollo) il gradiente elettrochimico del cloro nei primi anni di vita è diverso e l'attivazione del recettore-canale per il GABA causa fuoriuscita di cloro, depolarizzazione e ipereccitabilità

Il recettore-canale per il GABA è un eteropentamero contenete subunità alfa, beta, gamma ecc.

La biologia molecolare ha dimostrato l'esistenza di diverse subunità alfa, beta e gamma che possono combinarsi in modo diverso nelle varie aree del SNC

Quindi in diverse aree del cervello vi sono varie forme di recettore-canale per il GABA che possono avere sensibilità diversa per i farmaci

Vi sono tre maggiori classi di farmaci che attivano i recettori-canale del GABA: le benzodiazepine, i barbiturici e l'alcool

Le benzodiazepine sono modulatori allosterici del GABA per il recettore. La loro attività richiede quindi la presenza del GABA (per questo portano difficilmente a morte)

I barbiturici attivano il recettore-canale per il GABA anche indipendentemente dal GABA. La depressione del SNC che essi causano è dose dipendente e, quando interessa il centro del respiro, causa morte dovuta ad arresto respiratorio

L'alcool attiva in modo indiretto alcuni sottotipi di recettori-canale per il GABA. La sintomatologia dovuta all'alcool è quindi diversa da quella dovuta a benzodiazepine e barbiturici. Tuttavia l'alcool potenzia gli effetti di queste due classi di farmaci

### **LE BENZODIAZEPINE**

Sono modulatori allosterici del GABA per il recettore canale

Il loro legame aumenta l'affinità del GABA per il recettore causando aumento della frequenza di apertura del canale al cloro, iperpolarizzazione e depressione dell'attività delle cellule nervose

Vengono classificate come ansiolitici-sedativi



Il 15% degli adulti assume benzodiazepine (BDZ) almeno 1 volta all'anno

Sono dotate di effetti ansiolitici

Sono ipnotico-sedativi (inducono sedazione fino al sonno) a dosi maggiori

A dosi superiori sono dotate di attività anticonvulsivante

Alcune BDZ sono miorilassanti in quanto inibiscono l'attività del motoneurone

Respiro: non vi è depressione ma può esservi potenziamento della depressione respiratoria indotta da barbiturici, alcool, morfina

Tossicità:

- Confusione fino a atassia, incoordinazione motoria, apatia, debolezza

- Sonnolenza

- Eccitazione in anziani e bambini (fino a incubi, ostilità)

- Rallentamento significativo dei riflessi motori

- Riduzione delle prestazioni intellettuali

- Alterazioni della memoria

Tolleranza e dipendenza: entrambe compaiono solo con trattamenti prolungati e con dosaggi alti. La sospensione brusca di un trattamento prolungato può creare gli stessi sintomi che avevano portato all'uso del farmaco (insonnia, incubi). Sospendere sempre gradualmente dopo un trattamento prolungato

Le diverse BDZ si distinguono in base al profilo farmacocinetico

La scelta di una BDZ è fatta sulla base della patologia e del profilo farmacocinetico: per effetti prolungati (ansia, miorilassamento) BDZ a emivita lunga; per effetti rapidi (insonnia da incapacità ad addormentarsi) BDZ a emivita breve; per effetti di durata intermedia (es insonnia da risveglio) BDZ a emivita intermedia

Molte BDZ devono essere metabolizzate per essere attive: variabilità individuale (o da patologia) per la risposta alle BDZ

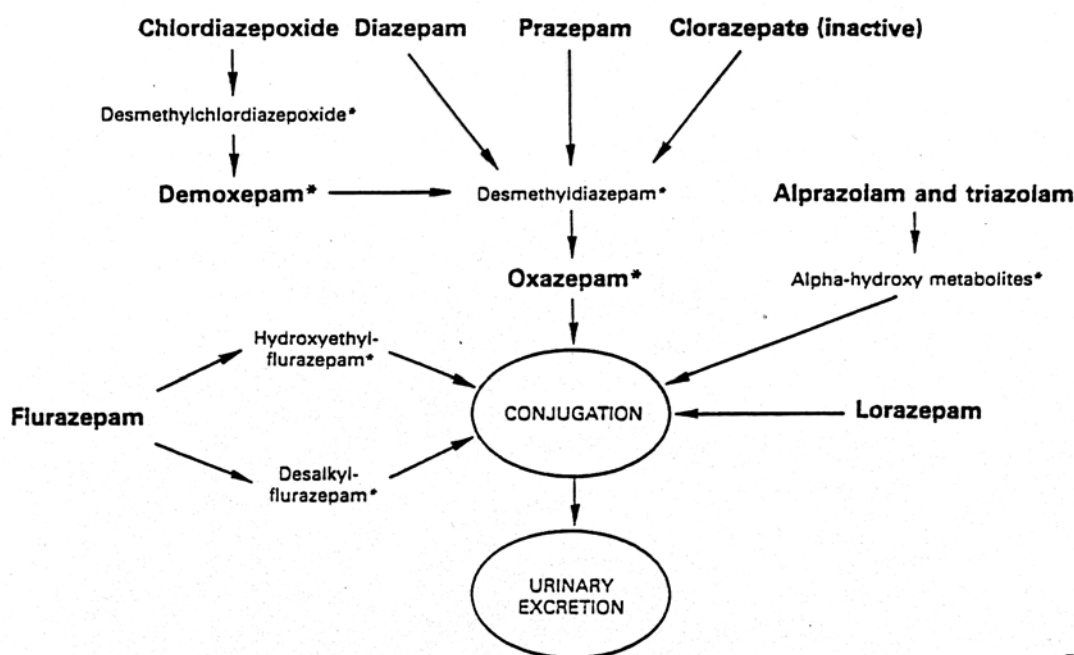


Figure 21-4. Biotransformation of benzodiazepines. (Boldface, drugs available for clinical use; \*, active metabolite.)

significantly by alkalinization of the urine. This is partly due to increased ionization at alkaline pH, since phenobarbital is a weak acid with a  $pK_a$  of 7.2. Only trace amounts of the benzodiazepines and less than 10% of a hypnotic dose of meprobamate appear in the urine unchanged.

**E. Factors Affecting Biodisposition:** The biodisposition of sedative-hypnotics can be influenced

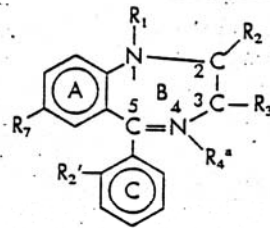
by several factors, particularly alterations in hepatic function resulting from disease, old age, or drug-induced increases or decreases in microsomal enzyme activities.

Generally, decreased hepatic function results in reduction of the clearance rates of drugs metabolized via oxidative pathways. This group includes many of the benzodiazepines, almost all of the barbiturates,

Table 21-1. Pharmacokinetic properties of benzodiazepines in humans.

Drug	Elimination Half-Life Range (hours)	Metabolites	Comments
Alprazolam	12-15	Active: $\alpha$ -hydroxyalprazolam	Rapid oral absorption.
Chlordiazepoxide	5-30	Active: desmethyl derivative, demoxepam, oxazepam	Poor intramuscular bioavailability.
Chlorazepate	50-100 (metabolites)	Active: desmethyldiazepam, oxazepam	Hydrolyzed to active form in stomach.
Diazepam	50-150	Active: desmethyldiazepam, temazepam, oxazepam	Poor intramuscular bioavailability.
Flunitrazepam	12-24	Active: desmethylflunitrazepam	Large volume of distribution.
Flurazepam	24-100 (metabolites)	Active: desalkyl derivative and others	Long elimination half-lives of active metabolites.
Lorazepam	10-18	Inactive: glucuronides	Elimination not much affected by age or liver disease.
Nitrazepam	24-36	Probably inactive	Large volume of distribution.
Oxazepam	4-10	Inactive: glucuronides	Slow oral absorption may delay onset of effects.
Prazepam	30-120	Active: desmethyldiazepam	Slow oral absorption.
Temazepam	5-8	Possibly active	Slow oral absorption.
Triazolam	3-5	Active: $\alpha$ -hydroxytriazolam	Rapid oral absorption.

Table 17-1. BENZODIAZEPINES: NAMES AND STRUCTURES \*



BENZODIAZEPINE	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>2'</sub>
Alprazolam	[Fused triazolo ring] <sup>b</sup>		H	Cl	H
Brotizolam †	[Fused triazolo ring] <sup>b</sup>		H	Cl	H
Chlordiazepoxide <sup>a</sup>	(-)	-NHCH <sub>3</sub>	H	[Thieno ring A] <sup>c</sup>	H
Clobazam <sup>a,†</sup>	-CH <sub>3</sub>	=O	H	Cl	H
Clonazepam	H	=O	H	Cl	H
Clorazepate	H	=O	H	Cl	H
Demoxepam <sup>a,†,‡</sup>	H	=O	-COO-	Cl	H
Diazepam	-CH <sub>3</sub>	=O	H	Cl	H
Flumazenil <sup>a,†</sup>	-CH <sub>3</sub>	=O	H	Cl	H
Flurazepam	[Fused imidazo ring] <sup>d</sup>		H	Cl	H
Halazepam	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	=O	H	Cl	[O=C <sub>2</sub> ] <sup>e</sup>
Lorazepam	-CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	=O	H	Cl	H
Midazolam	H	=O	H	Cl	H
Nitrazepam †	[Fused imadazo ring] <sup>f</sup>		H	Cl	H
Nordazepam †§	H	=O	H	Cl	H
Oxazepam	H	=O	H	Cl	H
Prazepam	-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	=O	H	Cl	H
Quazepam†	-CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	=S	H	Cl	H
Temazepam	-CH <sub>3</sub>	=O	H	Cl	H
Triazolam	[Fused triazolo ring] <sup>b</sup>		H	Cl	H

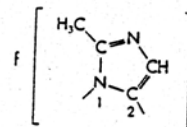
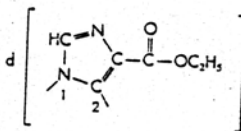
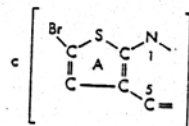
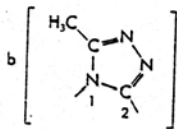
\* Alphabetical footnotes refer to alterations of the general formula; symbolic footnotes are used for other comments.

† Not available for clinical use in the United States.

‡ Major metabolite of chlordiazepoxide.

§ Major metabolite of diazepam and others; also referred to as nordiazepam and desmethyldiazepam.

<sup>a</sup> No substituent at position 4, except for chlordiazepoxide and demoxepam, which are N-oxides; R<sub>4</sub> is -CH<sub>3</sub> in flumazenil, in which there is no double bond between positions 4 and 5; R<sub>4</sub> is =O in clobazam, in which position 4 is C and position 5 is N.



<sup>e</sup> No ring C.

**Table 13-2.** Classification of benzodiazepines based on elimination half-life after oral administration

<i>Drug</i>	<i>Time to peak plasma concentration (hr)</i>	<i>Elimination half-life (hr)</i>	<i>Major active metabolites</i>
<i>Short- to intermediate-acting</i>			
Alprazolam	1-2	12-15	None
Lorazepam	1-6	10-18	None
Oxazepam	1-4	5-15	None
Temazepam	2-3	10-20	None
Triazolam	1-2	1.5-5	$\alpha$ -hydroxytriazolam
<i>Long-acting</i>			
Chlordiazepoxide	0.5-4	5-30	Desmethylchlordiazepoxide Demoxepam
Clorazepate*	1-2	30-100	Desmethyldiazepam
Diazepam	0.5-2	20-50	Desmethyldiazepam
Flurazepam*	0.5-1	47-100	Desalkylflurazepam
Halazepam	1-3	14	Desmethyldiazepam
Prazepam*	2.5-6	30-100	Desmethyldiazepam

\*Does not reach circulation as parent drug in clinically significant amounts. Values reflect the primary metabolite.

**Antianxiety agents**

<i>Nonproprietary name</i>	<i>Proprietary name</i>
<b>Benzodiazepines</b>	
alprazolam	Xanax
chlordiazepoxide	Librium
clorazepate	Tranxene
diazepam	Valium
halazepam	Paxipam
lorazepam	Ativan
oxazepam	Serax
prazepam	Centrax
triazolam	Halcion
<b>Diphenylmethane antihistamines</b>	
hydroxyzine hydrochloride	Atarax
hydroxyzine pamoate	Vistaril
<b>Propanediol carbamates</b>	
meprobamate	Equanil, Miltown
tybamate*	Tybatran
<b>Muscle relaxants</b>	
<i>Nonproprietary name</i>	<i>Proprietary name</i>
<b>Mephenesin-like</b>	
carisoprodol	Soma, Reia
chlorphenesin carbamate	Maolate
chlorzoxazone	Paraflex
mephenesin*	—
meprobamate	Miltown, Equanil
metaxalone	Skelaxin
methocarbamol	Robaxin
tybamate*	Tybatran
<b>Benzodiazepines</b>	
diazepam	Valium
<b>Miscellaneous</b>	
baclofen	Lioresal
cyclobenzaprine	Flexeril
dantrolene	Dantrium
orphenadrine	Nortflex

\*Not available in the United States

ESTRATTO DA

TRASMISSIONE GABAergica

M Serra, E. Sanna, G. Biggio

Università di Cagliari

Da: Farmacologia Generale e Molecolare, Clementi e Fumagalli,  
UTET

rimentali suggeriscono l'esistenza di più sottotipi di recettori GABA<sub>C</sub>, ma le loro funzioni fisiologiche non sono ancora note. Data la localizzazione preferenziale a livello della retina, potrebbero avere un ruolo nel controllo inibitorio delle risposte indotte dalla luce.

### Recettori GABA<sub>A</sub>

*I recettori GABA<sub>A</sub> sono recettori-canale permeabili agli ioni cloro*

Poiché il cloro è l'unico ione permeante attraverso il recettore GABA<sub>A</sub>, l'attivazione di quest'ultimo "fissa" il potenziale di membrana a quello d'equilibrio del Cl<sup>-</sup>, che normalmente è di circa -70 mV. L'attivazione di questo recettore riduce quindi, mediante una iperpolarizzazione, l'eccitabilità cellulare. Tuttavia, in alcuni distretti, come ad esempio alcune terminazioni a livello del midollo spinale e dendriti di specifici neuroni ippocampali e corticali, il potenziale d'equilibrio del Cl<sup>-</sup> sembra essere spostato verso livelli meno elettronegativi (probabilmente per carenza di sistemi di estrusione dello ione) e l'attivazione del recettore causa una perdita di cariche negative (lo ione esce dalla cellula); la conseguente depolarizzazione può generare un potenziale d'azione per attivazione dei canali al Na<sup>+</sup> voltaggio-dipendenti.

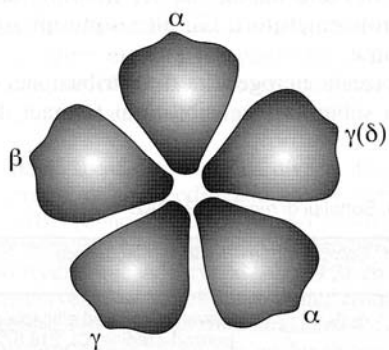
La risposta inibitoria indotta dall'attivazione del recettore GABA<sub>A</sub> si attua attraverso meccanismi pre- e postsinaptici. L'iperpolarizzazione postsinaptica è tipica dei neuroni encefalici (cellule corticali, cerebellari, ippocampali, ecc.). La risposta eccitatoria (depolarizzazione) a livello presinaptico si attua nel midollo spinale attraverso sinapsi asso-asoniche tra interneuroni GABAergici e le afferenze primarie eccitatorie che modulano l'attività dei motoneuroni.

### *Siti di legame per GABA, benzodiazepine e barbiturici*

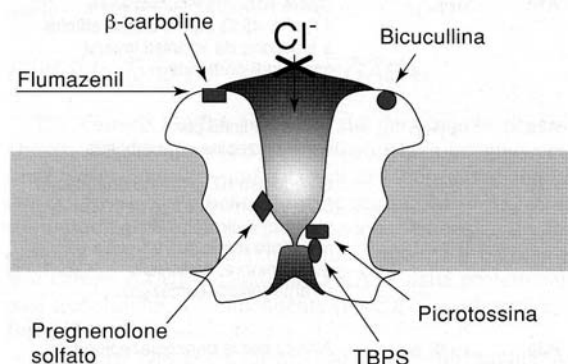
A livello del complesso recettoriale macromolecolare GABA<sub>A</sub> sono presenti i seguenti siti di legame per specifiche molecole (vedi Fig. 29.2):

1) *Sito di legame per il GABA, per i farmaci GABA mimetici (muscimolo) e GABA-antagonisti (bicucullina)*. Alla formazione di questo sito di legame, principalmente situato sulla subunità β del complesso macromolecolare, partecipano anche le altre subunità (α, γ, δ). L'interazione con il GABA o con un GABA mimetico si traduce nell'attivazione del canale allo ione cloro con conseguente iperpolarizzazione della membrana. La bicucullina blocca con meccanismo competitivo l'interazione GABA-recettore.

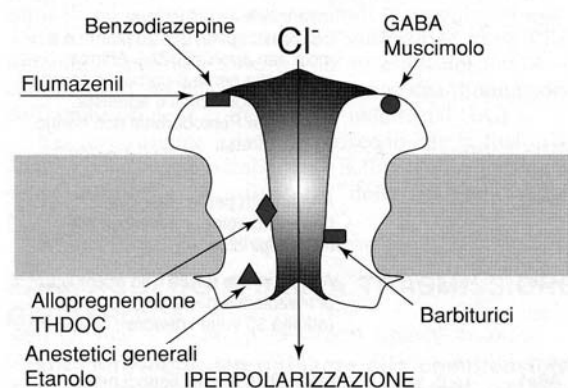
A) Subunità del recettore GABA<sub>A</sub>



B) Antagonisti e modulatori negativi



C) Agonisti e modulatori positivi



**Fig. 29.2.** Schema ipotetico della struttura molecolare del recettore GABA<sub>A</sub>. In (A) sono indicate le tre differenti subunità α, β, γ (o δ in alternativa) necessarie per costituire un recettore funzionalmente sensibile sia all'azione dei barbiturici (α-β) che delle benzodiazepine (α, β, γ). Il rapporto tra subunità (nella figura 2α, 1β, 2γ) può variare nelle diverse aree del SNC. In (B) e (C) sono ipotizzati due differenti momenti funzionali del canale allo ione cloro: (B) inibito, (C) attivato. Sono riportati i siti di legame di differenti modulatori negativi (B) e positivi (C).

2) Sito di legame per le benzodiazepine ed altre molecole benzodiazepino-mimetiche (ciclopirroloni, imidazopiridine, triazolopiridine, β-carboline). Questo sito si trova su differenti subunità (α, β, γ) ed è riconosciuto anche da ligandi ad azione agonista inversa (β-carboline), molecole capaci di ridurre l'interazione del GABA col proprio sito di riconoscimento ed indurre effetti (ansia-convulsioni) opposti alle benzodiazepine. Il sito di legame delle benzodiazepine è riconosciuto anche da farmaci privi di attività intrinseca (agonisti competitivi come il flumazenil), ma capaci di antagonizzare sia l'azione degli agonisti che quella degli agonisti inversi. Questo sito oggi denominato "recettore centrale per le benzodiazepine", ha la capacità di mediare effetti opposti (ansiolitico-ansigenico; anticonvulsivante-convulsivante; ipnotico-sonnolitivo) quando viene attivato rispettivamente dagli agonisti o dagli agonisti inversi. Questi opposti effetti sono dovuti alla modulazione allosterica dell'interazione del GABA col proprio sito di riconoscimento (facilitazione per gli agonisti, inibizione per gli agonisti inversi) e la conseguente attivazione o riduzione di attività del canale ionico.

3) Sito di legame per i barbiturici e per il loro antagonista, la picrotossina e siti di legame per alcuni derivati organofosforici come il *t*-butilbiciclofosforonato (TBPS). I siti di legame per i barbiturici e per il TBPS si trovano all'interno del canale per lo ione cloro. Tale localizzazione risulta essere di fondamentale importanza funzionale: infatti i barbiturici, al contrario delle benzodiazepine sono capaci di potenziare il flusso di ioni cloro anche in assenza di GABA. La picrotossina ed il TBPS (farmaci ad azione antagonista rispettivamente diretta e allosterica sui barbiturici), bloccano la funzione del canale ionico e inducono effetti farmacologici opposti (ansia, convulsioni).

Il recettore GABA<sub>A</sub> è un importante sito d'azione anche per molti anestetici generali, sia solubili che volatili, per l'etanolo, e per numerosi derivati steroidei. In particolare, questi ultimi composti sembrano possedere dei siti di legame specifici a livello del canale anionico.

I siti di legame per il GABA, le benzodiazepine, i barbiturici e gli steroidi pur essendo entità distinte sono legati tra loro in modo funzionale: l'attivazione e l'inibizione di uno di questi siti da parte di uno specifico ligando agonista o antagonista determina una variazione nella capacità degli altri siti ad interagire con i propri ligandi specifici. Questo può tradursi in una modulazione positiva (facilitazione) o negativa (inibizione) della funzione dell'attività del recettore-canale.

Ad es., l'interazione di una benzodiazepina col proprio sito di legame determina una modificazione allosterica nella conformazione delle subunità che partecipano alla formazione del sito di legame per il GABA tale da favorirne l'interazione con il neurotrasmettitore e la con-



seguinte apertura del canale agli ioni cloro. L'influsso di cariche negative (Cl<sup>-</sup>) che ne consegue determina iperpolarizzazione. Al contrario, se un agonista inverso interagisce con il sito di legame per le benzodiazepine, si ha il fenomeno opposto cioè la subunità che contiene il sito di riconoscimento per il GABA assume una conformazione "negativa" tale da sfavorire l'interazione col GABA e quindi ridurre la capacità di apertura del canale. È importante sottolineare che l'attivazione del sito di legame per le benzodiazepine favorisce sia l'interazione del GABA col proprio sito che quello dei barbiturici con il rispettivo sito di legame. Allo stesso modo la presenza di una molecola di barbiturico sul sito di legame localizzato a livello del canale favorisce il legame sia del GABA che delle benzodiazepine con i rispettivi siti di riconoscimento. Al contrario sia le benzodiazepine che i barbiturici riducono la capacità di modulatori negativi quali la picrotossina e il TBPS di interagire con il recettore GABA<sub>A</sub>. Questi effetti a livello molecolare spiegano il sinergismo farmacologico tra benzodiazepine, barbiturici e steroidi.

### Il recettore GABA<sub>A</sub> è formato da più subunità

Il recettore GABA<sub>A</sub> è probabilmente un pentamero costituito da almeno tre delle seguenti subunità glicoproteiche (Fig. 29.2): subunità  $\alpha$  (53 kDa),  $\beta$  (57 kDa),  $\gamma$  (54 kDa),  $\delta$  (53 kDa) e  $\epsilon$  (55 kDa).

Recentemente, ricostruendo in vitro un recettore composto da due coppie di subunità  $\alpha$  e  $\beta$  è stato possibile ottenere un recettore-canale permeabile al Cl<sup>-</sup> e sensibile al GABA, all'antagonista competitivo bicucullina, ai barbiturici e alla picrotossina. Tale recettore "sintetico" è però insensibile alle benzodiazepine, per la cui azione farmacologica è richiesta la presenza della subunità  $\gamma$ . L'utilizzazione di anticorpi specifici per le diverse subunità del recettore GABA<sub>A</sub> ha permesso di mettere in evidenza che i principali sottotipi di recettori GABA<sub>A</sub> presenti nelle diverse aree del cervello e in organi periferici sono formati da subunità  $\alpha$  e  $\beta$  assemblate con una o più subunità  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ . La varietà di classi di subunità che possono partecipare a formare il recettore GABA<sub>A</sub> e l'esistenza di varie isoforme di una stessa subunità (almeno sei subunità  $\alpha$ , quattro  $\beta$ , tre  $\gamma$ ), aventi ciascuna una propria distribuzione nelle diverse aree cerebrali, suggerisce che nel SNC dei mammiferi possano essere presenti numerosi sottotipi di recettori GABA<sub>A</sub>. La classificazione e la composizione in subunità dei recettori GABA<sub>A</sub> proposta dall'Unione Internazionale di Farmacologia (IUPHAR) è riportata nella tabella 29.3. Come si può notare dalla tabella, i diversi sottotipi di recettore GABA<sub>A</sub> differiscono anche per il profilo farmacologico. Dei vari sottotipi il più abbondante nel SNC murino è A1a, presente nella maggior parte delle aree cerebrali. A2a e A3a sono anche essi relativamente abbondanti: il primo presente nei motoneuroni spinali e sulle cellule piramidali ippocampali, il secondo è presente

su neuroni colinergici e monoaminergici dove sembra giocare un ruolo importante nel controllo del rilascio dei neurotrasmettitori. Gli altri sottotipi sono meno abbondanti.

La spiccata eterogeneità di distribuzione, composizione in subunità e sensibilità ai farmaci da un lato

Tab. 29.3. Sottotipi di recettori GABA<sub>A</sub>.

Recettori GABA <sub>A</sub>	Composizione	Profilo farmacologico
A1a	$\alpha_1 \beta_n \gamma_2$	Elevata affinità ed efficacia per benzodiazepine, CL 218.872, zolpidem, 2-oxoquazepam e $\beta$ -carboline
A1b	$\alpha_1 \beta_n \gamma_3$	Come A1a, ma 400 volte meno sensibile allo zolpidem
A1c	$\alpha_1 \beta_n \gamma_1$	Come A1b, ma il flumazenil e il Ro 15-4513 hanno bassa affinità e agiscono da agonisti inversi come le $\beta$ -carboline
A2a	$\alpha_2 \beta_n \gamma_2$	Elevata affinità per benzodiazepine e $\beta$ -carboline
A2c	$\alpha_2 \beta_n \gamma_1$	Gli agonisti BZ/ $\omega$ hanno una affinità 2-20 volte minore che per A2a. L'affinità dello zolpidem è 5 volte maggiore ma la sua efficacia è molto minore. Insensibili all'antagonista flumazenil.
A3a	$\alpha_3 \beta_n \gamma_2$	Affinità per le benzodiazepine e le $\beta$ -carboline simile ai recettori A1a. Azione intermedia (affinità 10 volte inferiore) per zolpidem, CL 218872 e 2'-oxoquazepam.
A4a	$\alpha_4 \beta_n \gamma_2$	Insensibile alle classiche benzodiazepine, allo zolpidem e a molti altri agonisti BZ/ $\omega$ . Affinità intermedia per le $\beta$ -carboline (agonisti inversi). Flumazenil è agonista. Propofol e Pentobarbital non hanno azione diretta.
A5a1	$\alpha_5 \beta_{1/3} \gamma_2$	Alta affinità per le classiche benzodiazepine. Insensibile alle imidazopiridine.
A5b3	$\alpha_5 \beta_3 \gamma_3$	Affinità simile a A5a1 ad eccezione di triazolam e $\beta$ -carboline (affinità 30 volte inferiore).
A6a1	$\alpha_6 \beta_1 \gamma_2$	Insensibile a tutti i ligandi per i recettori BZ/ $\omega$ . Il flumazenil e il Ro 15-4513 diventano agonisti parziali e alcune $\beta$ -carboline agonisti inversi diventano antagonisti.
A6a2	$\alpha_6 \beta_{2/3} \gamma_2$	Stesse proprietà di A6a1. È selettivamente antagonizzato dalla furosamide.
A1a/A6a2	$\alpha_6 \alpha_1 \beta_{2/3} \gamma_2$	Associa le proprietà di A1a e A6a2.

spiega la differente efficacia clinica di varie benzodiazepine, dall'altro incoraggia la ricerca di farmaci che, agendo specificatamente su un sottotipo recettoriale, possano svolgere attività terapeutiche (ad esempio ansiolitico o anticonvulsivante) scevre degli effetti collaterali dei farmaci attualmente in uso.

Come spesso accade per subunità diverse di uno stesso recettore, gruppi di geni codificanti alcune subunità del recettore GABA<sub>A</sub> sono localizzati su uno stesso cromosoma. Per esempio, i geni  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ , e  $\gamma_2$ , i cui prodotti formano il sottotipo recettoriale A1a (vedi Tab. 29.3) che è il più diffuso nel cervello, sono raggruppati nel cromosoma 5 umano, i geni  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\gamma_1$  sono sul cromosoma 4 e i geni  $\alpha_5$ ,  $\beta_3$ , e  $\gamma_3$  sul cromosoma 15. Queste evidenze suggeriscono una certa forma di regolazione coordinata per la trascrizione di gruppi co-localizzati di geni. Tuttavia, questa regola non è sempre valida, come nel caso dei recettori  $\alpha_3\beta\gamma_2$ , in cui il gene  $\alpha_3$  è localizzato sul cromosoma X differente da quello su cui è localizzato il gene  $\gamma_2$ .

#### Fosforilazione del recettore GABA<sub>A</sub>

Il recettore GABA<sub>A</sub> è substrato per diverse protein chinasi. Siti di consenso per la fosforilazione sono presenti nella sequenza aminoacidica del loop intracellulare compreso tra i segmenti transmembrana M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> delle subunità  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ . La subunità  $\alpha$  viene fosforilata da una proteina chinasi non identificata, la subunità  $\beta$  dalla proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA) e dalla proteina chinasi fosfolipidi/Ca<sup>2+</sup>-dipendente (PKC), e la subunità  $\gamma_2$  è fosforilata da tirosina chinasi.

Si ritiene che la fosforilazione cAMP-dipendente sia uno dei più importanti meccanismi molecolari nella regolazione della funzione del recettore GABA<sub>A</sub>. Ad es., la fosforilazione cAMP-dipendente aumenta la velocità di desensitizzazione del recettore in neuroni corticali e ippocampali ed in preparazioni cerebrali di sinaptosomi, ma non in neuroni spinali. Anche l'attivazione della PKC (ottenibile sperimentalmente con gli esteri del forbolo o con analoghi del diacil glicerolo) causa una diminuzione dell'ampiezza delle correnti al Cl<sup>-</sup> indotte dal GABA.

Nel loro insieme i dati suggeriscono che la fosforilazione giochi un ruolo importante nella regolazione, sia in senso inibitorio che attivatorio, della funzionalità del recettore GABA<sub>A</sub>.

### FARMACOLOGIA DELLA TRASMISSIONE GABAERGICA

Un contributo determinante alla comprensione del ruolo fisiopatologico e farmacologico svolto dai recettori GABA<sub>A</sub> si è avuto con la scoperta che i farmaci d'elezione nella terapia dei disturbi d'ansia e di alcune patologie convulsive quali le benzodiazepine e i barbiturici hanno specifici siti di legame a livello del recettore-canale GABA<sub>A</sub>. Con la successiva scoperta che molecole appartenenti ad altre categorie di farmaci (anestetici generali, steroidi,

etanolo) potenziano l'azione del GABA, si è potuto definitivamente chiarire il ruolo farmacologico che i recettori GABA<sub>A</sub> svolgono nel SNC dei mammiferi e di suggerire, per la prima volta, una ipotesi biologica per spiegare le alterazioni comportamentali che sono alla base di alcune patologie della sfera emozionale.

#### Le benzodiazepine

##### Tre classi di siti di legame per le benzodiazepine

Le benzodiazepine hanno siti di legame sul recettore GABA<sub>A</sub> ma distinti dal sito di legame per il GABA. L'attivazione del sito di legame delle benzodiazepine facilita l'interazione del GABA con i propri siti recettoriali: ciò si traduce in un aumento della frequenza dell'apertura del canale in presenza di GABA. Quindi le benzodiazepine, pur interagendo con siti di legame diversi da quelli del GABA, possono modulare positivamente la trasmissione GABAergica (modulazione allosterica).

L'Unione Internazionale di Farmacologia (IUPHAR) (Barnard et al., 1998) ha recentemente suggerito la nuova, più completa e per molti versi più attinente nomenclatura dei sottotipi di recettori GABA<sub>A</sub> e dei siti di legame delle benzodiazepine (v. Tab. 29.3). Tenendo conto delle eterogeneità dei recettori GABA<sub>A</sub> e dell'evidenza che i siti di legame per le benzodiazepine (ai quali si legano anche molecole non benzodiazepiniche come imidazopiridine, ciclopirroloni,  $\beta$ -carboline ecc.), sono presenti in differenti subunità e non esclusivamente nella subunità  $\alpha$ , la IUPHAR ha suggerito di abolire la vecchia nomenclatura che faceva uso di termini come "BZ<sub>1</sub>/BZ<sub>2</sub>" e "Recettore GABA/benzodiazepinico" e di sostituirla con la nuova riportata nella tabella 29.3. La sigla BZ/ $\omega$  indica il sito di legame per le benzodiazepine associato al recettore per il GABA. La nuova classificazione è basata sulla affinità dei vari ligandi per i siti di legame BZ/ $\omega$  per i differenti sottotipi di recettore GABA<sub>A</sub>.

Nella vecchia classificazione, i siti di legame per le BDZ venivano chiamati BZ<sub>1</sub>, BZ<sub>2</sub> e BZ<sub>3</sub>. Mentre i BZ<sub>1</sub> e BZ<sub>2</sub> sono stati descritti solo a livello neuronale nel SNC, BZ<sub>3</sub> è espresso dalle cellule gliali e da altri tipi cellulari non neuronali presenti in diversi organi quali fegato, rene, testicoli, polmoni, ovaio, surrene. BZ<sub>3</sub> è perciò chiamato sito di legame periferico per le benzodiazepine e non ha nessuna relazione funzionale con i vari sottotipi di recettori GABA. È generalmente accettato che i siti BZ<sub>1</sub> e BZ<sub>2</sub> mediano gli effetti farmacologici classici delle benzodiazepine, mentre il ruolo fisiologico e farmacologico del "recettore periferico" non è stato ancora definito. Studi recenti suggeriscono che questo sottotipo di recettore sia localizzato a livello mitocondriale dove parteciperebbe alla regolazione della sintesi di neurosteroidi (Tab. 29.4).

**Tab. 29.4.** Recettore periferico per le benzodiazepine.

	SNC	Organi periferici
Distribuzione	Cellule gliali	Polmone, Rene, Fegato, Testicoli, Ovaio, Surrene
Localizzazione subcellulare	Prevalentemente mitocondriale	
Struttura molecolare (subunità proteiche)	18-30 kDa	
Ligandi sintetici	Benzodiazepine: Diazepam, Flunitrazepam, 4-clorodiazepam Imidazopiridine: Alpidem, Zolpidem Derivati isochinolinici: PK 11195	
Ligandi endogeni	Porfirine Diazepam Binding Inhibitor (DBI)	
Ruolo Fisiologico	Non vi sono evidenze sperimentali che i recettori BZ <sub>3</sub> siano funzionalmente legati ai recettori GABA <sub>A,B,C</sub> e possano mediare alcuni effetti farmacologici delle benzodiazepine. La dimostrazione che l'attivazione dei BZ <sub>3</sub> partecipa alla biosintesi di alcuni derivati steroidei sia a livello periferico (corteccia del surrene/ovaio) che nel SNC ha suggerito una nuova affascinante ipotesi. "I recettori BZ <sub>3</sub> attraverso la produzione di steroidi potrebbero indirettamente modulare la funzione dei recettori GABA <sub>A</sub> ". Questa possibile connessione funzionale indiretta è consistente con l'evidenza che: i) i metaboliti del progesterone sono i più potenti modulatori positivi dei recettori GABA <sub>A</sub> ; ii) i recettori GABA <sub>A</sub> e gli ormoni steroidei svolgono un ruolo cruciale nelle risposte allo stress.	

*I farmaci ansiogeni si legano ai recettori GABA<sub>A</sub>: un contributo alla comprensione delle basi biologiche dell'ansia*

La comprensione del meccanismo molecolare attraverso il quale farmaci ansiolitici e anticonvulsivanti come le benzodiazepine favoriscono l'interazione del GABA col proprio recettore e la dimostrazione della eterogenità dei siti recettoriali per questi farmaci hanno suggerito l'ipotesi che alterazioni dell'efficienza della trasmissione GABAergica mediata dal recettore GABA<sub>A</sub> possono essere alla base dell'ansia e di alcune patologie epilettiche.

Un supporto a tale ipotesi è stato dato dall'evidenza che le β-carboline, molecole estratte per la prima volta dalle urine umane, hanno la capacità di legarsi ai siti di legame alle benzodiazepine e di indurre effetti opposti (ansia, convulsioni, insonnia) a quelli indotti dalle benzodiazepine. Le β-carboline ansiogene, proconvulsivanti e convulsivanti inducono i loro effetti interagendo specificamente con i siti di legame delle benzodiazepine associati al recettore GABA<sub>A</sub>. Esse hanno sulla trasmissione GABAergica, e in particolare sulle caratteristiche funzionali dei recettori GABA<sub>A</sub>, un effetto opposto a quello delle benzodiazepine. Infatti, le β-carboline modulano in senso negativo l'attività delle sinapsi GABA<sub>A</sub> riducendo la sensibilità del recettore al neurotrasmettitore. Questi risultati avvalorano l'ipotesi che la mancata o ridotta interazione del

GABA con il proprio sito recettoriale costituisca un evento di fondamentale importanza nella patogenesi dell'ansia e dello stato convulsivo.

La dimostrazione che farmaci come le benzodiazepine e le β-carboline rispettivamente antagonizzano o inducono i sintomi tipici degli stati ansiosi o di una situazione di stress, suggerisce (ma non dimostra direttamente) che nello stress, nelle crisi d'ansia fisiologica o nelle crisi convulsive si realizzi uno stato di alterata funzionalità dei sistemi GABAergici. In appoggio a questa teoria, studi recenti condotti sul ratto hanno dimostrato che lo stress produce rapidissime modificazioni biochimiche a livello delle sinapsi GABA<sub>A</sub> della corteccia e di altre aree cerebrali che si traducono in una ridotta capacità del GABA di interagire con i suoi recettori specifici. Infatti, lo shock elettrico, situazioni ambientali negative o lo stress dovuto alla manipolazione degli animali prima del sacrificio provocano una marcata riduzione della densità dei recettori GABA<sub>A</sub> con conseguente riduzione del tono inibitorio GABAergico. Quindi, uno stimolo stressante modifica la funzionalità dei recettori del GABA in modo simile a quanto fanno farmaci come le β-carboline che inducono effetti proconvulsivi, stress e convulsioni negli animali da laboratorio e ansia nell'uomo. Questi risultati e l'evidenza che le benzodiazepine, farmaci anti-stress e anti-convulsivanti che normalmente antagonizzano la sintomatologia dell'ansia, correggono in vivo e in vitro le modificazioni indotte sia dallo stress che dalle β-carboline sui recettori GABA<sub>A</sub>, rappresentano la conferma sperimentale del ruolo cruciale che questi recettori hanno nella patogenesi dell'ansia.

### *Gli agonisti parziali dei siti di legame BZ/ $\omega$ sono farmaci ansiolitici con minori effetti collaterali*

Una nuova classe di modulatori positivi dei recettori GABA<sub>A</sub> è rappresentata dagli agonisti parziali dei siti di legame BZ/ $\omega$ . Queste molecole si stanno proponendo in modo molto convincente come i potenziali nuovi ansiolitici. Infatti, pur mantenendo una buona attività ansiolitica e anticonvulsivante, questi farmaci produrrebbero meno sedazione, meno rilasciamento muscolare, minore atassia, dipendenza e tolleranza rispetto agli agonisti completi.

Ciò che caratterizza l'azione di alcuni degli agonisti parziali di recente sintesi, come bretazenil e imidazenil, è la capacità di attivare l'apertura del canale del recettore GABA<sub>A</sub> con una efficacia di gran lunga inferiore rispetto a quella esercitata dai classici agonisti completi (triazolam, alprazolam, lorazepam ecc.). A questa minore efficacia nell'attivare la funzione del canale fa riscontro una ridotta presenza di effetti collaterali. In particolare, il fatto di essere agonisti parziali per i siti di legame BZ/ $\omega$  fa sì che queste molecole siano in grado di stimolare la funzione GABAergica quando questa è inibita ma di essere praticamente prive di effetto in condizioni di normale funzionamento. L'imidazenil, un nuovo derivato benzodiazepinico oggi in corso di sperimentazione, ha una bassissima attività intrinseca ed acquista una particolare efficacia in tutte quelle condizioni che sono caratterizzate da una ridotta funzione dei recettori GABA<sub>A</sub>. La reale efficacia degli agonisti parziali dei recettori BZ/ $\omega$  nella terapia dei disturbi d'ansia rimane comunque da essere verificata e valutata attraverso una adeguata sperimentazione clinica.

### *Gli antagonisti dei siti di legame BZ/ $\omega$ e la dimostrazione della dipendenza fisica dalle benzodiazepine*

La prova inequivocabile che le benzodiazepine ansiolitiche e le  $\beta$ -carboline ansiogeniche inducono i loro effetti farmacologici attraverso l'interazione con specifici siti di legame (i recettori delle benzodiazepine) è stata ottenuta con la dimostrazione molecolare e farmacologica che il flumazenil, un antagonista specifico per siti di legame centrali delle benzodiazepine, è in grado di impedire con un meccanismo competitivo non solo il legame delle benzodiazepine ansiolitiche e anticonvulsivanti ma anche quello delle  $\beta$ -carboline ansiogene e convulsivanti con i loro rispettivi siti di legame.

Il flumazenil previene o abolisce *in vitro* e *in vivo* tutti gli effetti degli agonisti (benzodiazepine, ciclopironoli, imidazopiridine ecc.) e degli agonisti inversi ( $\beta$ -carboline). La disponibilità di questo strumento farmacologico ha inoltre permesso di stabilire in modo inequivocabile, sia a livello sperimentale che clinico, che le benzodiazepine inducono dipendenza fisica. Infatti, la somministrazione acuta del flumazenil scatena nel ratto, gatto, scimmia e uomo trattati cronicamente con diazepam o altre benzodiazepine, una drammatica crisi di astinenza caratterizzata da paura, apparente aggressività, tremori, rigidità, convulsioni, scialorrea, disturbi della vista.

La dipendenza da benzodiazepine e la maggiore severità dei sintomi nella crisi d'astinenza dipendono fortemente da diversi fattori: a) durata del trattamento (più di tre mesi); b) dosaggi elevati; c) farmacocinetica. Le molecole a breve durata d'azione, ad elevata attività intrinseca ed elevata affinità per il sito di legame, sono quelle che inducono più facilmente dipendenza e una severa crisi di astinenza. Minori rischi di dipendenza e crisi di astinenza meno severa si ottengono con molecole a lunga durata d'azione e una più debole attività intrinseca. L'antagonista competitivo flumazenil viene oggi utilizzato in rianimazione per antagonizzare gli effetti depressivi indotti da dosi intossicanti di benzodiazepine, in particolare quando questi farmaci vengono associati con etanolo o con barbiturici. Inoltre il flumazenil viene utilizzato per facilitare il risveglio da una anestesia indotta con benzodiazepine.

## **I barbiturici**

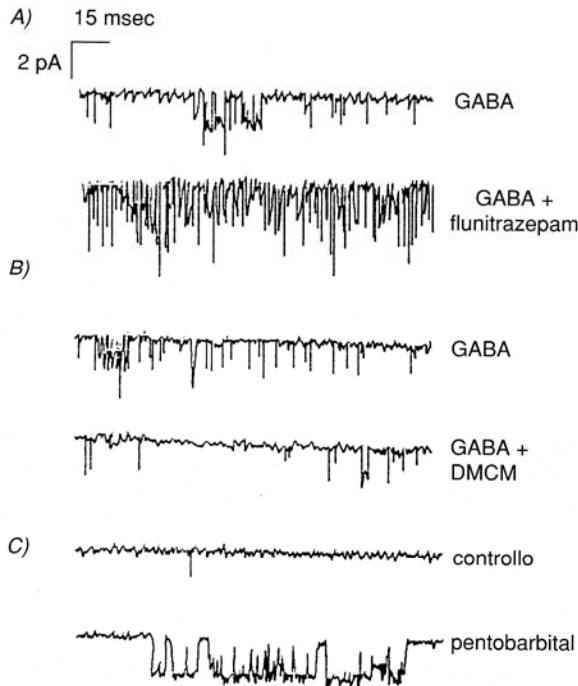
### *Farmaci attivi sul canale al cloro*

I barbiturici potenziano l'azione del GABA interagendo con siti recettoriali specifici localizzati sulla superficie luminare del canale ionico del recettore GABA<sub>A</sub>: l'occupazione di questi siti ha come effetto principale quello di aumentare il tempo medio di apertura del canale anche indipendentemente dalla presenza del neurotrasmettitore (Fig. 29.3). È utile ricordare che le benzodiazepine modulano la funzione del canale attraverso la facilitazione dell'azione del GABA, in assenza del quale perdono completamente di efficacia. Gli effetti di depressione delle attività del SNC sono autolimitanti (se la sinapsi è inibita al punto da non liberare GABA, l'effetto delle BDZ scompare), di entità variabile tra aree cerebrali (in funzione del sottotipo di recettore espresso) e, in genere, non conducono a morte per depressione respiratoria. Al contrario i barbiturici sono in grado di attivare un flusso di Cl<sup>-</sup> attraverso il recettore GABA<sub>A</sub> anche indipendentemente dalla presenza del neurotrasmettitore. La loro somministrazione si traduce in una attivazione funzionale di tutte le sinapsi GABAergiche centrali con depressione generalizzata, dose-dipendente del SNC con blocco dei centri respiratori e morte.

## **Steroidi e recettori GABA<sub>A</sub>**

### *Steroidi attivi sul SNC modulano l'attività del recettore GABA<sub>A</sub>*

L'evidenza che gli ormoni steroidei hanno attività biologica a livello del SNC è stata data da Selye già nel 1941 con la dimostrazione che alcuni di questi composti possiedono effetti sedativi, anestetici ed anticonvulsivanti. Studi più recenti hanno approfondito queste osserva-



**Fig. 29.3.** Correnti di singolo canale al cloro attivate da vari modulatori del recettore  $GABA_A$  in un "outside-out patch" staccato dalla membrana di cellule di corteccia cerebrale di ratto (A e B) o di cellule di midollo spinale di topo (C). A) La corrente attivata dal GABA ( $1 \mu M$ ) è potenziata dalla benzodiazepina flunitrazepam ( $1 \mu M$ ). B) La corrente attivata dal GABA ( $1 \mu M$ ) è inibita dalla  $\beta$ -carbolina DMC ( $5 \mu M$ ). C) Corrente attivata dal barbiturico pentobarbital ( $150 \mu M$ ); in questo caso il tracciato di controllo è ottenuto in assenza di GABA. I barbiturici inducono apertura del canale del recettore  $GABA_A$  anche in assenza del neurotrasmettitore e lo mantengono aperto per un tempo maggiore.

zioni e dimostrato che alcuni ormoni steroidei hanno un importante ruolo nel condizionare il comportamento e l'adattamento allo stress. La rapidità con la quale insorgono questi effetti esclude il coinvolgimento di un meccanismo trascrizionale e suggerisce più una diretta azione a livello di membrana su specifici recettori. In accordo con questa conclusione, Simmonds e coll. nel 1984 hanno dimostrato per la prima volta che il recettore  $GABA_A$  è un importante sito d'azione dell'anestetico steroideo alfaxalone. Più recentemente altri autori hanno dimostrato che due metaboliti del progesterone (allopregnanolone e allotetraidrosossicosterone) sono *in vitro* e *in vivo* tra i più potenti ed efficaci modulatori dei flussi di cloro associati ai recettori  $GABA_A$ .

Studi elettrofisiologici su recettori nativi o espressi in cellule trasfettate hanno dimostrato che questi steroidi facilitano l'interazione del GABA e delle benzodiazepine con i loro siti di legame potenziando il flusso di ioni cloro. Il meccanismo d'azione molecolare dipende dalla concentrazione di steroide: a basse concentrazioni si registra una facilitazione allosterica dell'azione del GABA; ad alte con-

centrazioni gli steroidi sono invece capaci di aprire direttamente il canale così come fanno i barbiturici. Questi risultati, insieme all'evidenza che lo stesso progesterone e i suoi metaboliti hanno una potente azione anticonvulsivante e anticonflittuale, suggeriscono che l'azione GABAergica degli steroidi possa fare parte di un meccanismo fisiologico di rilevante importanza nel controllo dell'attività di differenti nuclei cerebrali coinvolti nella regolazione delle emozioni e più in generale dell'eccitabilità neuronale. Sebbene questi studi abbiano dimostrato che gli steroidi sono attivi su molteplici sottotipi di recettori  $GABA_A$ , la diversa composizione in subunità del recettore può in alcuni casi alterare l'efficacia di alcuni steroidi. In recettori ricombinanti contenenti le subunità  $\alpha_{1-3}$  in combinazione binaria con  $\beta_1$  o ternaria con  $\beta_1$  e  $\gamma_2$ , l'allopregnanolone è più efficace nella combinazione contenente  $\alpha_1$ . Al contrario, la presenza della subunità  $\alpha_6$  ( $\alpha_6 \beta_1 \gamma_2$ ) riduce l'effetto di questo steroide. Inoltre, l'assenza della subunità  $\beta$  compromette l'effetto dell'alfaxalone mentre il potenziamento delle correnti cloro GABA-stimate da parte dell'allopregnanolone è maggiore nelle combinazioni contenenti  $\gamma_1$ . È interessante notare che la  $\gamma_1$  è espressa massivamente nelle cellule gliali, sede di intensa steroidogenesi.

Una scoperta fondamentale per capire il ruolo fisiologico degli ormoni steroidei è data dall'evidenza che nel cervello, alcune cellule gliali (soprattutto gli oligodendrociti), sono capaci di sintetizzare steroidi "ex novo" attraverso una via biosintetica che richiede l'attività del citocromo P-450. La dimostrazione che il SNC sintetizza steroidi e contiene a livello di membrana "bersagli" funzionali per una rapida azione di questi ormoni ha aperto un nuovo entusiasmante capitolo nello studio della farmacologia degli ormoni steroidei e della funzione dei recettori  $GABA_A$ . Gli steroidi prodotti per sintesi dalle cellule gliali cerebrali, quali il progesterone e l'allopregnanolone sono stati denominati *neurosteroidi* mentre gli steroidi sintetizzati in organi periferici (ovaio, surrene) e comunque attivi a livello centrale sono stati denominati *steroidi neuroattivi*.

È importante ricordare che esistono alcuni derivati steroidei (pregnenolone solfato; deidroepiandrosterone solfato) che modulano in maniera negativa la funzione del recettore  $GABA_A$ . Quest'ultima scoperta potrebbe avere una notevole importanza funzionale in quanto suggerisce l'esistenza di un sistema endogeno capace di attivare o inibire il recettore  $GABA_A$  come fanno rispettivamente i farmaci ansiolitici (agonisti) e i farmaci ansiogenici (agonisti inversi).

### Anestetici generali ed etanolo

#### *Alcuni anestetici generali e l'etanolo agiscono interagendo con i recettori $GABA_A$*

Gli anestetici generali sono una classe di farmaci, differenti tra loro sotto il profilo chimico, il cui meccanismo d'azione rimane ancora sconosciuto. Sebbene

numerose evidenze sperimentali abbiano suggerito in passato che gli anestetici generali abbiano un'azione non specifica a livello della componente lipidica della membrana neuronale (la loro potenza anestetica sembra ben correlata con la loro solubilità nei lipidi di membrana), negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato in maniera convincente che alcune proteine di membrana (recettori e canali ionici) rappresentano il bersaglio funzionale più importante per l'azione farmacologica degli anestetici generali. Nell'ambito di queste ricerche, la scoperta più importante è stata la dimostrazione che tali farmaci, a concentrazioni clinicamente efficaci, potenziano la funzione delle sinapsi GABA<sub>A</sub> nel SNC dei mammiferi. Si tratta in genere di un'azione marcata, con efficacia molto superiore a quella mostrata dalle benzodiazepine ansiolitiche e ipnotiche. A differenza di quest'ultima classe di farmaci, molti anestetici generali hanno anche la capacità, a concentrazioni superiori a quelle capaci di modulare l'azione del GABA, di attivare direttamente il canale allo ione cloro associato al recettore anche in assenza del GABA, un'azione che viene chiamata GABA-mimetica.

Lo studio di recettori GABA<sub>A</sub> clonati in diversi sistemi d'espressione ha permesso di dimostrare inequivocabilmente che l'azione di alcuni anestetici è fortemente dipendente da specifiche subunità che compongono il recettore stesso. Infatti è stato dimostrato che l'azione modulatrice e diretta del propofol e dell'etomidato è fortemente dipendente dalle subunità  $\alpha$  e  $\beta$  presenti nel recettore GABA<sub>A</sub>. Questa scoperta ha favorito successive ricerche che, con l'utilizzo di mutazioni sito-specifiche del DNA che codifica le diverse subunità del recettore GABA<sub>A</sub>, hanno individuato a livello delle subunità  $\alpha_1$ , due aminoacidi (serina 270 nel segmento transmembrana

M<sub>2</sub> e alanina 291 nel M<sub>3</sub>), e nella subunità  $\beta_1$ , un aminoacido (serina 265 nel M<sub>2</sub>), che sono fondamentali per gli effetti modulatori di anestetici come isoflurano e enflurano, ma anche dell'etanolo. In aggiunta, è stato dimostrato che lo stesso aminoacido sulla subunità  $\beta_1$  è fondamentale per l'azione dell'etomidato. È ipotizzabile quindi, che questi aminoacidi partecipino alla formazione di un sito o "tasca", localizzato fra i due segmenti transmembrana M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub>, che è deputato ad accogliere queste molecole e che media i loro effetti sulla funzione del recettore. È interessante notare, d'altra parte, come questi stessi aminoacidi non siano cruciali nell'azione modulatrice di altri anestetici generali come il propofol o il pentobarbital, suggerendo quindi che l'azione molecolare di questo gruppo eterogeneo di composti non si esplica attraverso uno stesso meccanismo molecolare.

L'etanolo potenzia la funzione dei recettori GABA<sub>A</sub> ed ha una azione sinergica con i barbiturici e le benzodiazepine. Il meccanismo d'azione che media l'effetto dell'etanolo a livello della sinapsi GABA<sub>A</sub> non è stato ancora interamente chiarito. Numerose ricerche sperimentali hanno dimostrato che concentrazioni ansiolitico-sedative (5-20 mM) di etanolo potenziano con differente efficacia la funzione dei recettori GABA<sub>A</sub> in molti neuroni di differenti aree cerebrali. In particolare si ritiene che mentre i neuroni cerebellari, corticali e spinali siano più sensibili all'etanolo di quelli ippocampali. In aggiunta, è stato ipotizzato che l'azione dell'etanolo sui recettori GABA<sub>A</sub> sia indiretta e possa coinvolgere diversi meccanismi di fosforilazione mediati da chinasi intracellulari (es. PKC). Queste scoperte suggeriscono l'esistenza di recettori GABA<sub>A</sub> sensibili e insensibili all'azione dell'etanolo e sono in accordo con il concetto di eterogeneità molecolare di questi recettori.

## BOX 2: Riassunto schematico dei principali interventi farmacologici sulle sinapsi GABAergiche

**1. SINTESI:** Non sono noti farmaci in grado di aumentare selettivamente la sintesi del GABA. Al contrario alcuni inibitori della GAD (isoniazide e acido amino-ossiacetico) riducendo la sintesi di GABA, inducono attività ansiogena e convulsivante.

**2. CAPTAZIONE:** Farmaci come l'acido 2,4 diaminobutirrico (DABA), l'acido nipecotico e la  $\beta$ -alanina inibiscono la captazione di GABA neuronale e gliale e posseggono attività antiepilettica. Questi farmaci non hanno però trovato una valida applicazione nella pratica clinica.

**3. CATABOLISMO:** Un'altra modalità per incrementare le concentrazioni di GABA, è rappresentata dalla somministrazione di inibitori della GABA-T.

Tra questi ricordiamo l'etanolamina-o-solfato, il  $\gamma$ -vinil-GABA e l'acido valproico, farmaco ad attività anticonvulsivante.

**4. RECETTORE GABA<sub>A</sub>:** Gli agonisti recettoriali come muscimolo, isoguvacina, THIP e acido imidazolacetico, capaci di attivare il recettore GABA<sub>A</sub>, non hanno trovato applicazione terapeutica. Gli antagonisti recettoriali come la bicucullina, hanno effetto convulsivante.

**5. SITO DI LEGAME DELLE BENZODIAZEPINE (BZ/ω):** A questo sito, alla cui formazione partecipano differenti subunità, si legano farmaci con diversa struttura chimica che esplicano effetti positivi (agonisti) o negativi (agonisti inversi) sulla trasmis-