

Received: 2006.09.24  
Accepted: 2006.11.21  
Published: 2007.01.05

## Hipokretyny – rola w regulacji rytmu sen-czuwanie i patogenezie narkolepsji\*

### Hypocretins: Involvement in the regulation of sleep-wakefulness cycle and pathogenesis of narcolepsy

Małgorzata Berezińska<sup>1</sup>, Jolanta B. Zawilska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>2</sup> Zakład Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

#### Streszczenie

Hipokretyny (oreksyny) to dwa nowo odkryte neuropeptydy pochodzące z tego samego prekursora – preprohipokretyny. Sekwencje aminokwasowe hipokretyn są bardzo zbliżone u różnych gatunków ssaków i u człowieka. Perikariony neuronów syntetyzujących hipokretyny występują głównie w tylnej i bocznej części podwzgórza, jednakże ich aksony docierają niemal do wszystkich struktur ośrodkowego układu nerwowego. Hipokretyny wywierają swoje działania za pośrednictwem swoistych receptorów błonowych, Hcrtr-1 i Hcrtr-2, należących do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G. Spośród działań fizjologicznych hipokretyn najlepiej poznano ich rolę w regulacji cyklu sen-czuwanie. Pełnią one rolę czynnika podtrzymującego i konsolidującego stan czuwania oraz umożliwiającego prawidłowe, kontrolowane przejścia między stanem czuwania i snem; hamują fazę REM snu. Hipokretyny są również jednym z elementów łączących układ regulacji snu i czuwania z głównym zegarem biologicznym organizmu. U większości pacjentów cierpiących na narkolepsję (chorobę charakteryzującą się niekontrolowanymi przejściami między stanem snu i czuwania oraz zaburzeniami fazy REM snu) stwierdzano bardzo małe lub niewykrywalne stężenia hipokretyn w płynie mózgowo-rdzeniowym, a w badaniach *post mortem* obserwowano zanik neuronów hipokretynowych w mózgu. U zwierząt objawy narkolepsji występowały na skutek uszkodzenia neuronów hipokretynowych w mózgu, wyłączenia genu kodującego syntezę preprohipokretyny, mutacji bądź wyłączenia genu *Hcrtr-2*. Sądzi się, że narkolepsja jest wynikiem zaburzonej ośrodkowej transmisji hipokretynowej. U człowieka degeneracja neuronów hipokretynowych ma prawdopodobnie podłoże autoimmunologiczne. Wyjaśnienie roli hipokretyn w powstawaniu narkolepsji może się przyczynić do opracowania nowych strategii leczenia tej choroby.

#### Słowa kluczowe:

hipokretyny • narkolepsja • zaburzenia snu • REM • choroby autoimmunologiczne • ośrodkowy układ nerwowy

#### Summary

Hypocretins (also called orexins) are two newly discovered neuropeptides originating from the same precursor, preprohypocretin. The amino-acid sequences of hypocretin are highly conserved among vertebrates. Cells bodies of hypocretin neurons are restricted mainly to the lateral and ventral hypothalamus, while hypocretin fibers project throughout the brain, including several areas implicated in the regulation of the sleep/wakefulness cycle. Hypocretins act on their targets via two specific, membrane-bound, G-protein-coupled receptors, Hcrtr-1 and Hcrtr-2. Among the va-

\* Praca finansowana przez MNiSW, grant nr 2 PO6D 025 29 (JBZ).

rious physiological actions ascribed to hypocretins, the strongest evidence are for their involvement in the integration and stabilization of arousal networks. Degeneration of hypocretin neurons or genetic mutations that prevent the normal synthesis of hypocretins, or their receptors, cause human and animal narcolepsy, a neurological disorder of excessive sleepiness and abnormalities in REM sleep. Recent data point to an autoimmune origin for human narcolepsy. It is believed that understanding the role of hypocretins in the pathology of narcolepsy will create the basis for the development of new strategies to effectively treat this disease.

**Key words:** hypocretins • narcolepsy • sleep disorders • REM • autoimmune diseases • central nervous system

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_61/9975.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/9975.pdf)

**Word count:** 4633

**Tables:** 1

**Figures:** 2

**References:** 152

**Adres autorki:** prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska, Zakład Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź; e-mail: jzawilska@pharm.am.lodz.pl

**Wykaz skrótów:** **ACh** – acetylocholina; **ARAS** – wstępujący siatkowaty układ wzbudzający; **DR** – jądra szwu; **GABA** – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy; **GLU** – kwas glutaminowy; **HA** – histamina; **Hcrt-1** – hipokretyna 1; **Hcrt-2** – hipokretyna 2; **Hcrtr-1 (OX<sub>1</sub>R)** – receptor typu 1 hipokretyny; **Hcrtr-2 (OX<sub>2</sub>R)** – receptor typu 2 hipokretyny; **HLA** – białka układu zgodności tkankowej; **5-HT** – serotonina; **LC** – miejsce sinawe; **LDT** – jądro grzbietowo-boczne nakrywki; **MCH** – hormon zagęszczający melaninę; **PLC** – kinaza białkowa C; **PPT-LDT** – jądra konarowo-mostowe i grzbietowo-boczne nakrywki; **REM** – faza snu z szybkim ruchem gałek ocznych; **SCN** – jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza; **TMN** – jądro guzowo-suteczkowe; **VLPO** – brzuszno-boczne jądro przedwzrokowe.

## ODKRYCIE HIPOKRETYN

Badania nad hipokretynami mają krótką historię. Peptydy te zostały odkryte w 1998 r. przez dwie niezależne grupy stosujące odmienne podejścia badawcze, genetyczne i farmakologiczne. Grupa kierowana przez J.G. Sutcliffe'a prowadząc badania, których celem było zidentyfikowanie 38 różnych mRNA występujących w podwzgórzu szczura, wykazała że jeden z nich (nazwany „klonem 35”) koduje syntezę peptydu zbudowanego ze 130 reszt aminokwasowych (aa). Jest on prekursorem dwóch białek składających się z 39 aa i 29 aa. Ze względu na występowanie tych białek w bocznej części podwzgórza (**hypothalamus**) oraz ich podobieństwo strukturalne do hormonu jelitowego sekretyny (**secretin**) nadano im nazwę hipokretyny (**hypocretins**), hipokretyna 1 (Hcrt-1) i hipokretyna 2 (Hcrt-2), a białko prekursorowe nazwano preprohipokretyną [33]. W tym samym czasie grupa kierowana przez M. Yanagisawę poszukując endogennych ligandów receptorów sierocych związanych z białkami G wyizolowała z wyciągu podwzgórza szczura dwa peptydy pobudzające receptor oznaczony symbolem HFGAN72 – silnie działający peptyd 33 aa oraz peptyd 28 aa o znacznie słabszym działaniu. Następnie badacze ci odkryli drugi receptor, pobudzany w równym stopniu przez oba peptydy oraz sklonowali komplementarny DNA (cDNA) kodujący syntezę białka prekursorowego tych peptydów [115]. Nowo odkrytym peptydom nadano nazwę oreksyny (oreksyna A i oreksyna B), od greckiego słowa *orexis* oznaczającego apetyt, gdyż ich wstrzyk-

nięcie do komór bocznych mózgu szczura stymulowało pobieranie pokarmu u zwierząt [115]. Po ustaleniu struktury pierwszorzędowej hipokretyn i oreksyn okazało się, że oreksyna A jest identyczna z hipokretyną 1, a oreksyna B z hipokretyną 2 [74,116]. Od tego czasu w piśmiennictwie równoważnie używane są obie nazwy peptydów. Odkrycie hipokretyn, a następnie poznanie ich roli w kontroli ośrodkowej transmisji monoaminergicznej, cholinergicznej, GABA-ergicznej i glutaminianergicznej stanowiło istotny przełom w zrozumieniu mechanizmu regulacji snu i czuwania, oraz stworzyło naukowe podstawy do wyjaśnienia neuropatologii narkolepsji.

## BUDOWA PEPTYDÓW

Preprohipokretyna ssaków (człowieka, świni, psa, myszy, szczura) składa się ze 130-131 aa. U człowieka gen kodujący preprohipokretynę znajduje się na chromosomie 17. Jest on zbudowany z 1432 par zasad (pz), a w jego skład wchodzi dwa eksony zbudowane ze 143 i 473 pz przedzielone intronem (816 pz) [116]. U szczura i u myszy preprohipokretyna jest kodowana przez odcinek DNA składający się z 569 pz; mysi gen *Hcrt* jest umiejscowiony na chromosomie 11 [33]. Preprohipokretyna zawiera 33-aminokwasową sekwencję sygnałową i trzy miejsca, w których może być cięta przez enzymy proteolityczne. Dwa z czterech możliwych produktów cięcia peptydu – hipokretyna 1 (aminokwasy 34–66) i hipokretyna 2 (aminokwasy 69–97), mają czternaście identycznych reszt aminokwasowych (46% ho-



Sekwencje aminokwasowe ludzkiej hipokretyny 1 (Hcrt-1) i hipokretyny 2 (Hcrt-2)																																	
Hcrt-1	Q	P	L	P	D	C	C	R	Q	K	T	C	S	C	R	L	Y	E	L	L	H	G	A	G	N	H	A	A	G	I	L	T	L
Hcrt-2						R	S	G	P	P	G	L	Q	G	R	L	Q	R	L	L	Q	A	S	G	N	H	A	A	G	I	L	T	M
Sekwencje aminokwasowe hipokretyny 1 u człowieka i różnych gatunków zwierząt																																	
Człowiek, szczur, mysz, świnia, pies, bydło domowe	Q	P	L	P	D	C	C	R	Q	K	T	C	S	C	R	L	Y	E	L	L	H	G	A	G	N	H	A	A	G	I	L	T	L
Żaba płataną			A	P	D	C	C	R	Q	K	T	C	S	C	R	I	Y	D	I	L	R	G	T	G	N	H	A	A	G	I	L	T	L
Sekwencje aminokwasowe hipokretyny 2 u człowieka i różnych gatunków zwierząt																																	
Człowiek	R	S	G	P	P	G	L	Q	G	R	L	Q	R	L	L	Q	A	S	G	N	H	A	A	G	I	L	T	M					
Świnia, pies	R	P	G	P	P	G	L	Q	G	R	L	Q	R	L	L	Q	A	S	G	N	H	A	A	G	I	L	T	M					
Mysz, szczur	R	P	G	P	P	G	L	Q	G	R	L	Q	R	L	L	Q	A	N	G	N	H	A	A	G	I	L	T	M					
Żaba płataną	R	S	D	F	Q	T	M	Q	S	R	L	Q	R	L	L	Q	G	S	G	N	H	A	A	G	I	L	T	M					

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowych hipokretyn różnych gatunków zwierząt i człowieka. Wg [74], zmodyfikowano

mologii strukturalnej), oraz siedem reszt aminokwasowych identycznych z sekretyną. Tak duże podobieństwo w budowie pierwszorzędowej nie występuje jednakże między hipokretynami a innymi peptydami należącymi do rodziny glukagon/naczyniowoaktywny peptyd jelitowy (VIP)/sekretyna. Budowa pierwszorzędowa ludzkiej hipokretyny 1 jest identyczna z hipokretyną 1 myszy, szczura, świni, psa i bydła domowego, natomiast różni się sześcioma resztami aminokwasowymi od hipokretyny 1 żaby płataną (*Xenopus laevis*). Ludzka hipokretyna 2 różni się jedną resztą aminokwasową od peptydu świni i psa, dwiema resztami aminokwasowymi od peptydu myszy i szczura, oraz siedmioma – od hipokretyny 2 żaby płataną [36,74]. Przypuszcza się, że hipokretyny 1 i 2 mogą ulegać amidacji w obrębie C-końca [116]. Hipokretyna 1 podlega ponadto transamidacji w rejonie N-końcowym, w wyniku której powstaje cykliczny pyroglutamyl. W obrębie hipokretyny 1 występują dwa mostki dwusiarczkowe, utworzone między cysteinami Cys<sup>6</sup>-Cys<sup>12</sup> i Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>14</sup>. Uważa się, że te cechy budowy decydują o większej sile działania hipokretyny 1 i jej większej stabilności w porównaniu z hipokretyną 2 [115]. Wykazano, że hipokretyna 1 jest bardziej lipofilna i trwała w płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi niż hipokretyna 2 [67]. Stężenia hipokretyny 1 w mózgu i rdzeniu kręgowym są 2-5-krotnie mniejsze od poziomów hipokretyny 2 [29,30,98].

#### SZLAKI HIPOKRETYNOWE W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

U dorosłych szczurów obecność mRNA preprohipokretyny stwierdzono głównie w mózgu oraz – w niewielkiej ilości – w jądrach [33,74,126]. U szczura, myszy, świnki morskiej i człowieka wykryto niewielką liczbę neuronów zawierających preprohipokretynę w przewodzie pokarmowym [74,126]. Obie hipokretyny występują także w siatkówce człowieka – w komórkach amakrynowych i zwojowych, w warstwie spłotowatej wewnętrznej i zewnętrznej oraz w wewnętrznych segmentach fotoreceptorów [119]. W mózgu myszy Hcrt mRNA pojawia się już w czasie rozwoju embrionalnego, ale jego gwałtowny wzrost na-

stępuje po trzech tygodniach życia postnatalnego. U myszy nie stwierdza się wykrywalnych różnic w ilości Hcrt mRNA między dorosłymi samicami i samcami, co sugeruje, że funkcja hipokretyny najprawdopodobniej nie zależy od płci [33].

Tabela 1 przedstawia rozmieszczenie neuronów zawierających hipokretyny w mózgu szczura w oparciu o analizę stopnia ekspresji mRNA oraz poziomu immunoreaktywności, głównie hipokretyny 1 i preprohipokretyny. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań wskazują na to, że rozmieszczenie neuronów hipokretynowych w mózgu innych gatunków ssaków jest bardzo zbliżone do tego opisanego dla szczura [12,34,74,124].

Perikariony neuronów hipokretynowych stwierdzono przede wszystkim w podwzgórzu. Są one rozmieszczone symetrycznie (obustronnie) w bocznych obszarach podwzgórza, głównie w części okołosklepieniowej (~50% neuronów), oraz w jądrach brzuszno-przyśrodkowym, grzbietowo-przyśrodkowym, łukowatym i w wyniosłości pośrodkowej [17, 23,27,31,33,50,60,61,98]. W podwzgórzu między neuronami hipokretynowymi występują neurony z MCH (melanin-concentrating hormone) [17,74]. Niewielkie skupiska neuronów zawierających hipokretynę 2 zidentyfikowano w ciele migdałowatym, prądkowiu i w obszarze brzusznie granicznym z komorą boczną mózgu [25]. Neurony hipokretynowe są zróżnicowane pod względem wielkości (wymiary ciał komórkowych 15–40 μm) oraz kształtu (sferyczne, wrzecionowate, wielobiegunowe), a ich liczbę w całym mózgu szczura szacuje się między 1100 a 3400 [22,31,33,53,74,98,107]. W hipokretynowych neuronach podwzgórza stwierdzono obecność sekrecyjnego białka Narp (neuronal activity-regulated pentraxin) – regulatora procesu synaptogenezy [14,26,110]. Przypuszcza się, że białko to może odpowiadać za część niereceptorowych działań hipokretyn [124].

Mimo stosunkowo małej liczby perikarionów neuronów hipokretynowych w podwzgórzu ich aksony tworzą szeroką sieć

Tabela 1. Rozmieszczenie hipokretyn w ośrodkowym układzie nerwowym szczura. Wg [74], zmodyfikowano

Część mózgu		Poziomy hipokretyn i stopień unerwienia przez włókna hipokretynowe w poszczególnych rejonach mózgu.
		Niski w rejonach takich jak kora mózgowa, układ węchowy, hipokamp, ciało migdałowate i zwoje podstawy.
Międzymózgowie	Podwzgórze	Wysoki w niektórych rejonach np. obszar tylny, boczny i okołosklepieniowy, jądra brzuszno- i grzbietowo- przyśrodkowe, wyniosłość pośrodkowa; niższe poziomy w części nerwowej przysadki mózgowej. Do większości rejonów podwzgórza dociera niewielka lub umiarkowana liczba włókien hipokretynowych.
	Wzgórze	Wysoki w jądrze przykomorowym i środkowo- przyśrodkowym; do innych rejonów wzgórza dociera niewielka do umiarkowanej liczba włókien hipokretynowych.
Mózdzek		Niewielka liczba włókien hipokretynowych.
Pień mózgu		Największa liczba włókien hipokretynowych dociera do miejsca sinawego. Umiarkowana do niewielkiej liczba włókien unerwia inne rejony pnia mózgu, takie jak jądra szwu, jądra nerwu błędnego, trójdzielnego i twarzowego, jądro pasma samotnego, istotę czarną i twór siatkowaty.
Rdzeń kręgowy		Unerwienie hipokretynowe występuje na całej długości rdzenia kręgowego. Obecność peptydów stwierdzono w całej istocie szarej i niektórych regionach istoty białej.

obejmującą rozległe obszary ośrodkowego układu nerwowego. W podwzgórzu aksony neuronów zawierających hipokretynę docierają niemal do wszystkich jego elementów strukturalnych. Ponadto docierają one m.in. do kory mózgowej, kory zakrętu obręczy, opuszki węchowej, wzgórza, przegrody, ciała migdałowatego, istoty czarnej, pnia mózgu oraz rogów bocznych i tylnych rdzenia kręgowego [23,25,27,29, 30,31,60,61,74, 96,97,115,137]. Szczególnie gęste unerwienie hipokretynowe mają miejsca sinawe, jądra szwu, twór siatkowaty rdzenia przedłużonego, jądra przykomorowe wzgórza i jądra przegrody [34,74,107]. Wykazano, że neurony hipokretynowe są pobudzane przez neurony glutaminianergiczne, cholinergiczne oraz neurony zawierające peptydy: wazopresynę, oksytocynę, neurotensynę, cholecystokininę, CRF (corticotropin-releasing factor) i GLP-1 (glucagon-like peptide-1) [34,74,123]. Z kolei neurony GABA-ergiczne, katecholaminergiczne, serotonergiczne, zawierające neuropeptyd Y lub leptynę hamują aktywność neuronów hipokretynowych [34,74,123].

#### RECEPTORY HIPOKRETYN: BUDOWA, WYSTĘPOWANIE, WEWNĄTRZKOMÓRKOWE SZLAKI TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Dotąd opisano, sklonowano i scharakteryzowano dwa receptory hipokretyn: receptor typu 1, Hcrtr-1 ( $OX_1R$ ), oraz receptor typu 2, Hcrtr-2 ( $OX_2R$ ). Ludzkie receptory Hcrtr-1 i Hcrtr-2 składają się odpowiednio z 425 i 444 reszt aminokwasowych. U człowieka geny kodujące receptory hipokretyn występują na chromosomie 1 (Hcrtr-1) i 6 (Hcrtr-2); są one zbudowane z siedmiu eksonów poprzedzielanych sześcioma intronami [74,115]. Receptory Hcrtr-1 i Hcrtr-2 należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (G-protein-coupled receptors – GPCR) – grupa  $\beta$  rodziny receptorów rodopsynowych (poprzednio rodzina A receptorów GPCR). Do grupy  $\beta$  należą m.in. receptory takich peptydów, jak neuropeptyd FF, neuropeptyd Y, cholecystokinina, neurotensyna, tachykinina, TSH (thyroid stimulating hormone), wazopresyna i oksytocyna [43]. Stopień homologii budowy pierwszorzędowej między receptorem Hcrtr-1 a Hcrtr-2 wynosi 64%, natomiast między recepto-

rami Hcrtr a innymi receptorami z grupy  $\beta$  tylko 28–31% [74]. Ludzkie i szczurze receptory są identyczne w 94% (Hcrtr-1) i w 95% (Hcrtr-2) [115]. Hipokretyna 1 pobudza receptor Hcrtr-1 w stężeniach nanomolowych, natomiast hipokretyna 2 ma do niego znacznie niższe, o 2–3 rzędy wielkości, powinowactwo. Obie hipokretyny wykazują zbliżone powinowactwo do receptora Hcrtr-2. Uważa się zatem, że receptor Hcrtr-1 jest selektywnym receptorem hipokretyny 1, natomiast receptor Hcrtr-2 jest nieselektywnym receptorem obu hipokretyn [74,115].

W podwzgórzu receptory Hcrtr-1 występują głównie w jądrze brzuszno- przyśrodkowym, oraz – w mniejszym stopniu – w przyśrodkowym polu przedwzrostkowym, jądrach przednio-bocznym, przykomorowym i grzbietowo- przyśrodkowym, bocznym jądrze suteczkowym i tylnym polu podwzgórzowym. Receptory Hcrtr-2 występują w podwzgórzu głównie w jądrze przykomorowym oraz jądrach brzuszno- przyśrodkowym i grzbietowo- przyśrodkowym, jądrze guzowo- suteczkowym, jądrze łukowatym, a także w polach podwzgórzowych tylnym i bocznym. Poza podwzgórzem dużą gęstość receptorów Hcrtr-1 stwierdzono w grzbietowym jądrze szwu, przykomorowym jądrze wzgórza, nawlecze szarej, obszarze CA1 i CA2 hipokampa, korze zakrętu obręczy, miejscu sinawym, przegrodzie i przysadce mózgowej. Z kolei receptory Hcrtr-2 występują głównie w guzku węchowym i warstwie VI kory mózgowej, a także w jądrze półleżącym przegrody, jądrach wzgórza przykomorowym i środkowo- przyśrodkowym, jądrach niskowzgórza, przegrodzie, przednim jądrze przedpokrywowym, obszarze CA3 hipokampa, grzbietowym jądrze szwu, mózdzku i przysadce mózgowej [68,74,81,135]. Receptory Hcrtr-1 występują w siatkówce człowieka – na komórkach amakrynowych i zwojowych, w warstwie spłotowanej wewnętrznej i zewnętrznej, oraz segmentach wewnętrznych fotoreceptorów [119]. Poza ośrodkowym układem nerwowym wykryto receptory hipokretynowe w przewodzie pokarmowym szczura, myszy, świnki morskiej i człowieka oraz w nadnerczach samców szczura [69,123].





Mechanizmy transdukcji sygnału uruchamianego przez receptory hipokretynowe są stosunkowo słabo poznane. Receptory te mogą aktywować białka  $G_q$ ,  $G_s$ ,  $G_{i/o}$  [57,58,74,109]. W neuronach oraz we wszystkich badanych dotychczas liniach komórkowych, w których dokonano ekspresji cDNA kodującego receptory Hcrtr-1 i Hcrtr-2 pobudzenie receptorów hipokretynowych prowadziło do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów wapniowych –  $[Ca^{2+}]_i$  [3,56,73,78,80,115,138]. Przypuszcza się, że wywołany przez hipokretyny wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  może być wynikiem następujących procesów:

- napływu  $Ca^{2+}$  przez kanały wapniowe niezwiązane z potencjałem [74,80];
- napływu  $Ca^{2+}$  przez kanały wapniowe zależne od potencjału błony komórkowej, proces ten prawdopodobnie dominuje w neuronach [70,77,136,139,146];
- pobudzenia fosfolipazy C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) [3,56,66,84,109,125].

PLC- $\beta$  hydrolizuje błonowy fosfolipid, fosfatydyloinozitol-(4,5)-bisfosforan, do 1,2-diacylglicerolu (DAG) i inozytolo-(1,4,5)-trisfosforanu ( $IP_3$ ).  $IP_3$  działając na swoiste receptory umiejscowione w błonie siateczki śródplazmatycznej powoduje uwolnienie zmagazynowanych  $Ca^{2+}$  i w konsekwencji wzrost  $[Ca^{2+}]_i$ , który dodatkowo jest potęgowany przez dokomórkowy napływ  $Ca^{2+}$  [7,108].

W badaniach przeprowadzonych na komórkach CHO (Chinese hamster ovary cells), w których dokonano ekspresji cDNA ludzkiego receptora Hcrtr-1, wykazano, że receptory Hcrtr-1 mogą, pobudzając różne białka G, hamować lub stymulować aktywność cyklazy adenylanowej. Przypuszcza się, że wzrost aktywności enzymu wynika z pobudzenia związanych z receptorem Hcrtr-1 białek  $G_s$ , a także białek  $G_i$  i aktywacji szlaku PLC- $\beta$   $\rightarrow$  kinaza białkowa C typu  $\delta$  [58]. Zaobserwowano ponadto, że w komórkach CHO pobudzenie receptorów Hcrtr-1 aktywuje szlak kinaz MAP (mitogen-activated protein kinases – MAPK) i kinaz aktywowanych przez stres (stress-activated mitogen kinases – SAPK), prowadząc następnie do zaprogramowanej śmierci komórki, apoptozy [4]. Obie klasy receptorów mogą hamować aktywność tzw. kanałów GIRK (G protein-coupled inward rectifier) – grupy kanałów potasowych związanych z białkami G, co z kolei prowadzi do pobudzenia neuronów [55].

#### ZNACZENIE HIPOKRETYN W UKŁADZIE REGULACJI SNU I CZUWANIA

Występowanie neuronów hipokretynowych w mózgu, szlaki hipokretynowe i ich połączenia z innymi układami neuroprzekaźnikowymi wskazują na istotną rolę hipokretyn w kontroli snu i czuwania, pobierania pokarmów i procesów neuroendokrynych.

Podczas I wojny światowej przez wiele krajów przeszła epidemia *encephalitis lethargica*, wirusowej infekcji mózgu, powodującej u większości chorych głęboki i długotrwały stan senności. Zastosowanie dostatecznie silnych bodźców wybudzało chorych, ale utrzymywała się u nich silna skłonność do zasypiania. W oparciu o wyniki badań *post mortem* wiedeński neurolog Constantin von Economo wysnuł wniosek, że stan ten był spowodowany uszkodzeniem tylnej części podwzgórza oraz przedniej części śródmózgowia. Zbadał on także grupę osób, zarażonych podczas

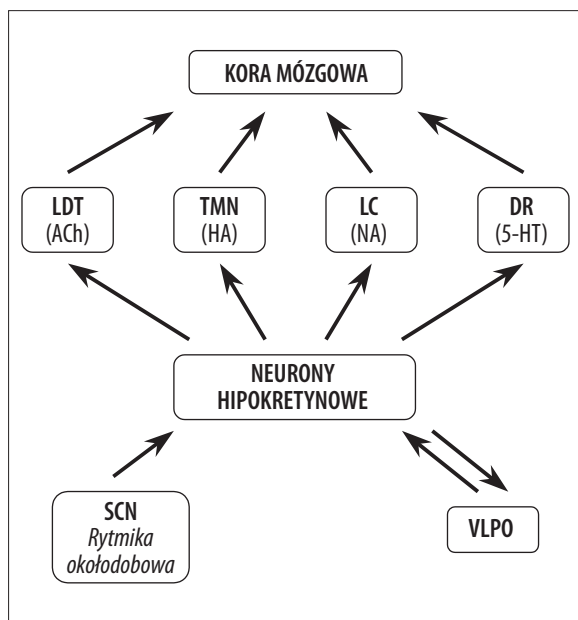
tej samej epidemii, które miały odwrotny problem: przedłużającą się bezsenność, która z kolei była wynikiem uszkodzenia pola przedwzrokowego i podstawy przodomózgowia. Von Economo zasugerował, że uszkodzenie tylnej części międzymózgowia może powodować chorobę znaną obecnie jako narkolepsja. Sugerował on również, że w podwzgórzu, w pobliżu skrzyżowania nerwów wzrokowych, mogą być umiejscowione neurony działające pronasennie, natomiast tylna część podwzgórza może zawierać neurony odpowiedzialne za utrzymywanie organizmu w stanie czuwania [118,141].

Obecnie uważa się, że w podwzgórzu funkcjonuje układ przełącznikowy, za pośrednictwem którego działają obecne w mózgu układy stymulujące bądź hamujące sen [91,118]. W mózgu zidentyfikowano wstępujący szlak odpowiedzialny za utrzymywanie stanu czuwania, tzw. wstępujący siatkowaty układ wzbudzający (ascending reticular activating system – ARAS). Szlak ten zaczyna się w obszarze obejmującym tylną część śródmózgowia i przednią część mostu. Dalej biegnie przez śródmózgowie do międzymózgowia, a następnie dzieli się na dwie odnogi – jedna z nich unerwia wzgórze, a druga podwzgórze. Szlak biegnący do wzgórza rozpoczyna się głównie w cholinergicznym jądrach konarowo-mostowym i grzbietowo-bocznym nakrywki (pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei – PPT-LDT) [38,51,114]. Aksony neuronów znajdujących się w tych jądrach docierają m.in. do jądra siatkowatego wzgórza. Uważa się, że jądro siatkowate odgrywa główną rolę w regulacji aktywności wzgórza, a projekcja cholinergiczna ma zasadnicze znaczenie dla aktywacji transmisji wzgórzowo-korowej [11,12,54].

W regulacji aktywności wzgórza i kory mózgowej biorą udział także neurony niewielkiej grupy jąder monoaminergicznymi, położonych w tylnej części śródmózgowia i przedniej części mostu. Aksony neuronów noradrenergicznego miejsca sinawego (locus coeruleus – LC) i serotonergicznymi jąder szwu – grzbietowego i pośrodkowego (dorsal and median raphe nuclei – DR) przebiegają przez boczną część podwzgórza i łączą się z aksonami neuronów histaminergicznego jądra guzowo-suteczowego (tubero-mammillary nucleus – TMN), tworząc wspólny szlak biegnący dalej do przodomózgowia [18,114,126].

Do cholinergicznymi i monoaminergicznymi jąder układu wzbudzającego docierają i tworzą z nimi liczne połączenia synaptyczne aksony neuronów brzuszno-bocznego jądra przedwzrokowego (ventrolateral preoptic nucleus – VLPO). Neurony te zawierają dwa neuroprzekaźniki o działaniu hamującym – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) i peptyd galaninę. VLPO jest z kolei unerwiane przez aksony neuronów jąder monoaminergicznymi, które hamują jego aktywność [45,128].

Neurony wymienionych wyżej jąder cholinergicznymi i monoaminergicznymi oraz VLPO wykazują charakterystyczne zmiany aktywności elektrycznej w przebiegu cyklu sen-czuwanie. W cholinergicznymi jądrach PPT-LDT podczas czuwania niemal wszystkie neurony wykazują szybką aktywność elektryczną. W fazie NREM snu aktywna jest tylko niewielka liczba neuronów, natomiast podczas fazy REM aktywność neuronów jąder PPT-LDT przypomina stan czuwania [40,83,127,132]. Z kolei noradrenergiczne



Ryc. 2. Główne połączenia neuronów hipokretynowych w mózgu.

LDT – boczno-grzbietowe jądro nakrywki, TMN – jądro guzowo-suteczkowe podwzgórza, LC – miejsce sinawe, DR – jądra szwu, VLPO – brzuszno-boczne jądro przedwzrokowe, SCN – jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza, ACh – acetylocholina, GABA – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, GLU – kwas glutaminowy, HA – histamina, 5-HT – serotonina, NA – noradrenalina

neurony LC, serotoninergetyczne neurony DR i histaminergiczne neurony TMN wykazują szybkie wyładowania elektryczne w stanie czuwania. Ich aktywność jest wolniejsza podczas snu NREM, natomiast w czasie fazy REM są one nieaktywne, co spowodowało nadanie im nazwy komórek wyłączających REM (REM-off cells) [105,118]. Neurony VLPO wykazują aktywność elektryczną głównie w czasie snu, jest ona wówczas dwukrotnie większa niż podczas czuwania [45,128]. Różnice w aktywności układów pobudzających i hamujących w różnych fazach cyklu sen-czuwanie (czuwanie, sen NREM i sen REM) są prawdopodobnie odpowiedzialne za występowanie i regulację tak różnych stanów behawioralnych [118,126].

Model podwzgórzowego układu przełącznikowego, zaangażowanego w regulację rytmu sen-czuwanie zakłada istnienie układu ujemnego sprzężenia zwrotnego między działającymi pobudzającymi układami cholinergicznym (PPT-LDT) i monoaminergicznym (LC/DR/TMN) a działającym hamująco VLPO. Aktywne podczas snu neurony VLPO hamują neurony monoaminergiczne, zmniejszając ich pobudzające działanie na korę mózgową, a dodatkowo uwalniają się spod ich hamującego wpływu, nasilając swoją własną aktywność. Z kolei w stanie czuwania neurony monoaminergiczne hamują aktywność VLPO, uwalniając się jednocześnie spod ich hamującego wpływu. Opisana pętla sprzężenia zwrotnego, złożona z dwóch silnie hamujących się wzajemnie elementów, w warunkach fizjologicznych może funkcjonować tylko w jednym z dwóch stanów – aktywny jest tylko układ pobudzający (czuwanie) albo tylko układ hamujący (sen), brak natomiast stanów pośrednich. W technice tego rodzaju układ określa się

jako obwód typu „flip-flop”. Wykluczenie stanów pośrednich między snem a czuwaniem zapobiega niebezpiecznej dla zwierzęcia sytuacji, w której znalazłoby się ono poza kryjówką będąc nie w pełni rozbudzone [118].

Do prawidłowego funkcjonowania układu typu „flip-flop” niezwykle istotna jest równowaga między obiema jego częściami. Sądzi się, że u ssaków rolę czynnika podtrzymującego stan czuwania pełnią hipokretyny. Należy podkreślić, że neurony hipokretynowe wykazują aktywność elektryczną głównie podczas czuwania – jest ona największa w trakcie poruszania się zwierzęcia, gdy napięcie mięśniowe jest duże, spada natomiast w spoczynku i zanika w czasie snu [78,93]. Aksony neuronów hipokretynowych docierają do różnych struktur ARAS zaangażowanych w regulację stanu wzbudzenia. Receptory hipokretyn wykryto w LC (Hcrtr-1), TMN (Hcrtr-2), DR, oraz w tworze siatkowatym mostu i śródmózgowia (Hcrtr-1 i Hcrtr-2) [10,15,41,49,81,135,147]. Badania elektrofizjologiczne wykazały, że hipokretyny bezpośrednio pobudzają neurony tych struktur mózgowych, zwiększając zatem aktywność układu ARAS [10,15,18,19,20,39,41,61,71,121,131,147]. Ponadto, w badaniach *in vitro* i *in vivo* zaobserwowano wzrost ekspresji c-Fos w neuronach LC pod wpływem działania hipokretyny 1 [17]. Hipokretyny bezpośrednio pobudzają także neurony jądra środkowo-pośrodkowego wzgórza (głównie poprzez receptory Hcrtr-2), które bierze udział w utrzymywaniu stanu ogólnego pobudzenia kory mózgowej [75,124]. Mikroiniekcje hipokretyn do LC, TMN i LDT prowadzą do wydłużenia okresu czuwania oraz do skrócenia snu wolnofalowego i fazy REM [16,123,124,145]. Hipokretyny, oprócz bezpośredniego działania pobudzającego na neurony zaangażowane w regulację snu i czuwania, mogą pośrednio, przez aktywację neuronów GABA-ergiczných, wywierać działanie hamujące [42,138]. Przypuszcza się, że rola hipokretyn w podtrzymywaniu stanu czuwania i w prawidłowych przejściach między stanem czuwania a snem zależy od równowagi pomiędzy ich bezpośrednim działaniem pobudzającym a hamującym działaniem neuronów GABA-ergiczných. Niedobór hipokretyn lub zmniejszenie natężenia transmisji hipokretynowej w mózgu powoduje niekontrolowane przejścia ze stanu czuwania w stan snu, charakterystyczne dla narkolepsji [34,91,118,123,124,130,150].

Coraz więcej danych doświadczalnych wskazuje na ważne, w aspekcie mechanizmu regulacji snu i czuwania, wzajemne połączenia między ośrodkową projekcją hipokretynową a układem okołodobowym. Aksony neuronów hipokretynowych unerwiają jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (suprachiasmatic nuclei – SCN), anatomiczne miejsce głównego zegara biologicznego, oraz listek ciała kolankowatego bocznego (intergeniculate leaflet – IGL) – ważny element układu okołodobowego [23,123,124,140]. Natomiast neurony hipokretynowe położone w bocznej części podwzgórza są bezpośrednio unerwiane przez włókna glutaminianergiczne pochodzące z SCN [2,24,130], a ich aktywność, mierzona stopniem ekspresji c-Fos, oscyluje w rytmie dobowym [82]. Hipokretyny znajdujące się w siatkówce mogą wpływać na funkcjonowanie komórek zaangażowanych w przekazywanie informacji świetlnej do SCN, uczestnicząc w ten sposób w synchronizacji rytmów okołodobowych [119]. W badaniach przeprowadzonych na dwóch gatunkach szczurów prowadzących odmienny tryb życia,



tj. na aktywnym w dzień afrykańskim szczurze trawnym (*Arvicanthis niloticus*) i aktywnym w nocy szczurze wędrownym (*Rattus norvegicus*) wykazano, że u obu gatunków ekspresja c-Fos w neuronach hipokretynowych podwzgórza była znamienne wyższa w fazie czuwania zwierząt w porównaniu do okresu snu [82]. Zaobserwowano także, że stężenia hipokretyny 1 w płynie mózgowo-rdzeniowym oscylują w rytmie dobowym bądź okołodobowym, uzyskując najwyższe wartości pod koniec okresu czuwania [35,117,148,150,151,152]. Rytm ten zanikał u zwierząt z lezjami SCN [152].

## NARKOLEPSJA

Narkolepsja jest przewlekłą chorobą neurologiczną trwającą od chwili pojawienia się do końca życia. Charakteryzuje się nadmierną sennością w ciągu dnia, katapleksją, paralizem przysennym i omamami przysennymi (tzw. tetradą narkoleptyczną). Ponadto pacjenci z narkolepsją mają zaburzony sen nocny z dużą liczbą wybudzeń. Chorzy uskarżają się na stałą, ciężką senność i na mimowolne „ataki snu”, które mogą wystąpić nie tylko w okolicznościach sprzyjających zaśnięciu (np. podczas monotonnej jazdy samochodem, oglądania programu telewizyjnego, po obfitym posiłku, lub podczas czytania książki), ale także podczas rozmowy, spaceru, spożywania posiłku, a nawet prowadzenia samochodu. Epizody snu trwają najczęściej 10–20 min i charakteryzują się występującą na początku fazą REM [104,142].

Występująca u większości pacjentów narkoleptycznych katapleksja polega na nagłym, napadowym, symetrycznym spadku napięcia mięśni szkieletowych, bez utraty przytomności. Napady te są często sprowokowane przez silne emocje (najczęściej pozytywne – śmiech, rozbawienie; rzadziej negatywne – złość) i zwykle trwają od kilku do kilkunastu sekund, rzadziej – do kilku minut. Spadek napięcia może dotyczyć wszystkich mięśni poprzecznie prążkowanych (z wyjątkiem mięśni gałkoruchowych i oddechowych), lub tylko wybranych grup mięśniowych dając objawy w postaci np. opadania głowy, powiek, żuchwy, upuszczania trzymanyh w dłoni przedmiotów. Napady katapleksji o słabym nasileniu mogą przebiegać pod postacią uczucia osłabienia i być niezauważane przez otoczenie pacjenta [104,142].

Porażenie przysenne występuje u 30–50% pacjentów cierpiących na narkolepsję i jest odczuwane, przy pełnym zachowaniu świadomości i pamięci epizodu, jako niemożność poruszania kończynami, zmiany pozycji ciała, otwarcia oczu, a nawet zaczerpnięcia głębszego oddechu. Odczuciom tym dodatkowo mogą towarzyszyć omamy o nieprzyjemnej lub przerażającej treści. Porażenie przysenne może się pojawić w czasie zasypiania, jak i budzenia się, zarówno w nocy, jak i podczas krótkich epizodów snu w ciągu dnia. Sądzi się, że porażenie przysenne, podobnie jak katapleksja, są spowodowane ograniczonym zmniejszeniem napięcia mięśni szkieletowych i odzwierciedlają ząębienie się stanu czuwania i fazy REM [104,142].

Zaliczane do parahalucynacji omamy hipnagogiczne i hipnopompiczne pojawiają się odpowiednio podczas zasypiania lub budzenia się i występują u około 20–40% pacjentów z narkolepsją. Są to krótkotrwałe doznania o charakterze

wzrokowym, słuchowym, cenestetycznym (np. uczucie kłucia, dotyku, zmiany pozycji części ciała, latania), niekiedy nieprzyjemne lub nawet przerażające [104,142].

Pełny zespół objawów występuje tylko u około 15% pacjentów cierpiących na narkolepsję [16,32,104,142]. Choroba może się ujawnić w każdym wieku, ale najczęściej pierwsze objawy występują około 15 roku życia. Około 36 roku życia występuje drugi, mniejszy od pierwszego, wzrost częstotliwości zachorowań [32]. W prawie połowie przypadków w ciągu roku przed pojawieniem się pierwszych objawów osiowych narkolepsji u chorego wystąpiło narażenie na silny stres psychiczny, nagle zmiana w rytmie snu i czuwania, wypadek, poważna choroba, ciąża [102]. Częstość występowania narkolepsji u ludzi jest oceniana na 0,02–0,18% [104,142]. Rodzinna narkolepsja występuje rzadko, a ryzyko wystąpienia choroby u krewnych pierwszego stopnia wynosi 1–2% [85,104,142]. Ponieważ wśród bliźniąt jednojajowych częstość występowania narkolepsji u obojga rodzeństwa wynosi tylko 25–31%, większość autorów uważa, że w rozwoju choroby bierze udział niezidentyfikowany jeszcze czynnik zewnętrzny, działający na osobę z wrażliwym genotypem [104,142]. Wśród osób chorych na narkolepsję stwierdzono pewną sezonowość urodzeń – najwięcej urodziło się w marcu, a najmniej we wrześniu. Wskazuje to na możliwość istnienia czynników środowiskowych, działających w okresie płodowym, które w połączeniu z wrażliwym genotypem prowadzą do rozwoju choroby [32].

## ZWIERZĘCE MODELE DO BADAŃ NAD NARKOLEPSJĄ – ZNACZENIE ZABURZEŃ W OŚRODKOWYM UKŁADZIE HIPOKRETYNOWYM

Występowanie narkolepsji opisano u zwierząt: niektórych ras psów (labradorów, dobermanów, jamników i pudli), miniaturowych koni oraz byków rasy Braham [5,62,68,111,112]. U dobermanów i labradorów z dziedzicznie przenoszoną narkolepsją wykryto autosomalny, recesywny gen odpowiedzialny za chorobę. Gen ten, pierwotnie nazwany *canarc-1* (od *canine narcolepsy*), scharakteryzowano następnie jako zmutowany *Hcrtr-2* [79], który koduje syntezę niepełnego białka receptora typu 2 hipokretyny. U każdej z tych ras mutacji uległ inny fragment genu. U dobermanów zmutowane białko receptora *Hcrtr-2* jest zbudowane z 247 aa (zamiast 444 aa), a w jego skład wchodzi tylko cztery z siedmiu domen transbłonowych. Z kolei u labradorów w 330 aa białku receptorowym brakuje fragmentu, który w prawidłowym receptorze znajduje się za szóstą domeną transbłonową. Tak zmutowane receptory nie ulegają wbudowaniu w błonę komórkową; utraciły one zdolność do wiązania hipokretyn [79]. U jamników z narkolepsją wykryto ponadto punktową mutację w obrębie pierwszego eksonu genu *Hcrtr-2*, 461G → A, która prowadzi do zamiany kwasu glutaminowego na lizynę w pozycji 54 białka receptorowego. Powstały w wyniku tej mutacji receptor także nie wiązał hipokretyn [62]. U dobermanów z mutacjami genu *Hcrtr-2* pierwsze objawy narkolepsji pojawiały się w 4 tygodniu życia, stopniowo nasilały się wraz z wiekiem, a pełnoobjawowa choroba występowała między 10 a 32 tygodniem życia [63,64]. W przeciwieństwie do rzadkich przypadków sporadycznie występującej, niedziedzicznej narkolepsji u dobermanów (z niewykrywalnymi stężeniami hipokretyn w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym), u zwierząt z mutacją genu *Hcrtr-2* stężenia



hipokretyn, a także gęstość neuronów hipokretynowych w mózgu nie odbiegały od wartości opisanych dla zwierząt zdrowych [63,111].

Myszy z wyłączonym genem kodującym syntezę preprohipokretyny, lub z knockoutem genu *Hcrtr-2* mają fenotyp charakterystyczny dla narkolepsji [21,22,94,95,143]. Występują u nich krótkie okresy zahamowania aktywności psychoruchowej podczas fazy ciemnej, kiedy myszy normalnie są aktywne, epizody nagłego przejścia ze stanu czuwania w fazę REM (sleep-onset REM – SOREM) nasilające się pod koniec fazy ciemnej, a w fazie jasnej – znaczne zmniejszenie latencji snu REM. Ataki narkolepsji najczęściej występowały podczas myszkowania, pielęgnacji sierści, grzebania w ściółce, wspinania się oraz jedzenia. Wydaje się, że u myszy zachowania wyzwalające atak są bardzo zindywidualizowane. Ataki narkolepsji częściej występują u myszy żyjących w grupie niż u myszy trzymanyh w klatkach pojedynczo, co sugeruje, że interakcje społeczne mogą nasilać objawy narkolepsji [22]. Zmiany behawioralne charakterystyczne dla narkolepsji i towarzyszące im zmiany w zapisie EEG występowały także u:

- szczurów, którym do komór bocznych mózgu wstrzyknięto hipokretynę 2 sprzęgniętą z saporyną – białkiem inaktywującym rybosomy [46,47],
- transgenicznych myszy i szczurów, u których do promotora genu preprohipokretyny został wprowadzony fragment genu ludzkiej ataksyny 3 [13,52,85].

Kompleks hipokretyna 2 – saporyna wiązał się do receptorów hipokretynowych (głównie *Hcrtr-2*) i indukował zanik neuronów, na których występowały receptory [46,47]. Obecność w neuronach hipokretynowych cytotoksycznej ataksyny 3 prowadziła natomiast do pourodzeniowej apoptozy tych neuronów i zaniku szlaków hipokretynowych w mózgu [13,52,85].

#### **NARKOLEPSJA – CHOROBA O PODŁOŻU AUTOIMMUNOLOGICZNYM?**

Wykrycie narkolepsji (bądź zmian behawioralnych charakterystycznych dla narkolepsji) u psów i zwierząt doświadczalnych i jej związek z zaburzeniami ośrodkowej transmisji hipokretynowej stanowiło istotny przełom w wyjaśnieniu neurologicznych podstaw tej choroby. Odkrycia te zapoczątkowały badania nad hipokretynami u chorych z narkolepsją. Dotychczas tylko u jednego pacjenta wykryto mutację genu kodującego hipokretynę. Należy podkreślić, że wystąpiła ona w nietypowym i ciężkim przypadku narkolepsji – o bardzo wczesnym początku (w 6 miesiącu życia), wysoce nasilonej senności i katapleksji; u pacjenta tego nie wykryto antygenu HLA DQB1\*0602 [106]. W większości przebadanych przypadków narkolepsji u ludzi stwierdzono bardzo małe lub niewykrywalne stężenie hipokretyny 1 w płynie mózgowo-rdzeniowym [8,9,37,48,72,88,100,101,112,149]. Przeprowadzone *post mortem* badania immunohistochemiczne oraz badania z wykorzystaniem techniki hybrydyzacji *in situ* wykazały dramatyczny ubytek (o 85–95%) liczby perikarionów neuronów hipokretynowych [14,25,99,100,106,133]. Należy podkreślić, że neurony zawierające MCH, które występują w bezpośrednim sąsiedztwie podwzgórzowych neuronów hipokretynowych, pozostały nienaruszone. W szczegółowych badaniach immunohistochemicznych stwierdzono znaczny spadek gęstości aksonów neuronów hipokretynowych w jądrach pod-

wzgórza i pnia mózgu pacjentów chorych na narkolepsję [133]. Zmiany te występowały głównie w strukturach, o których – przez analogię z danymi uzyskanymi dla zwierząt – sądzi się, że zawierają receptory *Hcrtr-2*. W miejscach degeneracji aksonów neuronów hipokretynowych wykazano wzmożoną proliferację komórek glejowych, co wskazuje na przebieg procesu zapalnego [134].

Liczne badania wykazały, że w grupie osób z narkolepsją częściej występują niektóre geny, które kodują białka układu zgodności tkankowej – HLA (human leukocyte antigens) klasy II. HLA DR2 często towarzyszy chorobom autoimmunologicznym, takim jak cukrzyca insulinozależna czy stwardnienie rozsiane. Allele HLA DQB1\*0602 i DQA1\*0102 występują u około 90% chorych na narkolepsję (szczególnie u pacjentów z katapleksją), podczas gdy w populacji ogólnej tylko u 12–38% [59,65,72,87,89,113,123]. Także u psów z dziedziczną postacią narkolepsji w mikrogleju stwierdzono zwiększoną ekspresję białek HLA klasy II [92,129]. Powyższe obserwacje sugerują udział czynnika autoimmunologicznego w patogenezie narkolepsji [32,34,65,86,89,123]. Przypuszcza się, że pod wpływem niezidentyfikowanych jeszcze czynników środowiska u osób z predyspozycjami genetycznymi dochodzi do aktywacji procesów autoimmunologicznych i w następstwie – do zaniku neuronów hipokretynowych. Dodatkowym dowodem przemawiającym za istotnym udziałem procesów autoimmunologicznych w patogenezie narkolepsji jest występowanie objawów narkolepsji z katapleksją i obniżonymi stężeniami hipokretyny 1 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z autoimmunologicznym zapaleniem mózgu [28,99,103].

#### **NARKOLEPSJA – LECZENIE DZIŚ I JUTRO**

Badania nad leczeniem narkolepsji są prowadzone w dwóch głównych kierunkach: z jednej strony syntetyzowane są nowe leki działające na ośrodkowe przekazywanie monoaminergiczne, zwalczające objawy choroby; z drugiej podejmowane są liczne próby działania przyczynowego, zmniejszającego niedobór hipokretyn lub zapobiegającego ubytkowi neuronów hipokretynowych [1,76,90,91,105,122,152].

Obecnie w leczeniu narkolepsji dostępne są wyłącznie leki działające objawowo. Są to głównie związki wpływające na przekazywanie monoaminergiczne w mózgu. W zwalczaniu nadmiernej senności stosuje się amfetaminopodobne związki psychostymulujące, które działając presynaptycznie stymulują przekazywanie dopaminergiczne – nasilają one uwalnianie dopaminy i hamują jej magazynowanie w neuronach [1,76,122]. Metylfenidat, lek odmienny strukturalnie od amin katecholowych, działa głównie poprzez blokowanie wychwyty zwrotnego dopaminy, a ponadto może stymulować przekazywanie adrenergiczne. Modafinil, niedawno wprowadzony do lecznictwa związek, wspomagający utrzymywanie stanu czuwania, ma niewyjaśniony do tej pory mechanizm działania, najprawdopodobniej jednak działa na wychwyt zwrotny dopaminy [1,6,59,76,120,144]. Antykataplektycznie działają leki przeciwdepresyjne – trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (np. imipramina, dezipramina, klomipramina), selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny (np. fluoksetyna) oraz inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny i serotoniny (np. wenlafaksyna) [1,76]. Wprowadzony niedawno do lecznictwa





kwasy  $\gamma$ -hydroksymasłowy (GHB) jest skuteczny w zwalczaniu różnych objawów narkolepsji – senności, katapleksji oraz nocnych zaburzeń snu. Mechanizm działania tego leku nie został do końca poznany. Wydaje się, że może polegać na stymulacji receptorów GABA<sub>B</sub> i przypuszczalnie receptorów swoistych dla GHB. GHB szybko zmniejsza nocne zaburzenia snu, wyraźnie zwiększając ilość snu wolnofalowego. Przy dłuższym stosowaniu wykazuje również działanie terapeutyczne w stosunku do katapleksji i senności w ciągu dnia [1,76,122]. Ze względu na wykorzystywanie GHB do celów niemedycznych oraz działania niepożądane i stosunkowo niski indeks terapeutyczny leku, stosowanie GHB musi podlegać ścisłej kontroli lekarskiej.

Biorąc pod uwagę postulowany patomechanizm narkolepsji, idealnym sposobem jej leczenia byłaby hipokretynowa terapia zastępcza. Można by stosować metody farmakologiczne – peptydy, proleki, agonistów receptorów hipokretynowych; metody z zakresu inżynierii genetycznej (wprowadzenie do mózgu genu kodującego preprohipokretynę z użyciem nośnika wirusowego) lub transplantacje komórek syntetyzujących hipokretynę. W badaniach na myszach z genetycznie uwarunkowanym niedoborem hipokretyn stwierdzono, że wstrzyknięcie hipokretyny do komór mózgu niemal całko-

wicie znosi zachowania odpowiadające katapleksji, fragmentację snu oraz epizody SOREM. W badaniach używano hipokretynę 1 ze względu na jej większą stabilność w porównaniu z hipokretyną 2 [85]. Hipokretyna 1, podana dożylnie lub domózgowo, zmniejszała objawy narkolepsji u psów z dziedziczną postacią choroby [44,50]. Wydaje się zatem, że peptyd ten mógłby być stosowany w leczeniu narkolepsji. Jednakże wadą hipokretyny 1 jest to, że po podaniu obwodowym (dożylnym) osiąga ona bardzo małe stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym, mimo dużego stężenia we krwi [44]. Wyniki wstępnych doświadczeń na myszach wskazują, że być może hipokretyna mogłaby efektywniej docierać do mózgu po jej podaniu donosowym, metoda ta wymaga jednak dalszych badań [90]. Od kilku lat prowadzone są badania mające na celu zsyntetyzowanie analogów hipokretyn oraz agonistów receptora Hcrtr-2, które lepiej przenikałyby przez barierę krew-mózg [1,122].

Ponieważ narkolepsja może mieć podłoże autoimmunologiczne podejmowane są próby powstrzymania rozwoju choroby przez podawanie (pacjentom oraz zwierzętom) immunoglobulin, bądź leków immunosupresyjnych, takich jak metyloprednizolon, azatiopryna i metotreksat. Jednakże wyniki tych badań nie są jednoznaczne [15,90].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Abad V.C., Guilleminault C.: Emerging drugs for narcolepsy. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 2004; 9: 281–291
- [2] Abrahamson E.E., Leak R.K., Moore R.Y.: The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal system. *Neuroreport*, 2001; 12: 435–440
- [3] Ammoun S., Holmqvist T., Shariatmadari R., Oonk H.B., Dethoux M., Parmentier M., Åkerman K.E., Kukkonen J.P.: Distinct recognition of OX<sub>1</sub> i OX<sub>2</sub> receptors by orexin peptides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003; 305: 507–514
- [4] Ammoun S., Lindholm D., Wootz H., Åkerman K.E., Kukkonen J.P.: G-protein-coupled OX<sub>1</sub> orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and -independent cell death through p38 mitogen-/stress-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 834–842
- [5] Baker T.L., Foutz A.S., McNeerney V., Mitler M.M., Dement W.C.: Canine model of narcolepsy: genetic and developmental determinants. *Exp. Neurol.*, 1982; 75: 729–742
- [6] Ballon J.S., Feifel D.: A systematic review of modafinil: Potential clinical uses and mechanisms of action. *J. Clin. Psychiatry*, 2006; 67: 554–566
- [7] Barańska J.: Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce. *Polskie Towarzystwo Biochemiczne*, Warszawa, 1992
- [8] Bassetti C., Gugger M., Bischof M., Mathis J., Sturzenegger C., Werth E., Radanov B., Ripley B., Nishino S., Mignot E.: The narcoleptic borderland: a multimodal diagnostic approach including cerebrospinal fluid levels of hypocretin-1 (orexin A). *Sleep Med.*, 2003; 4: 7–12
- [9] Baumann C.R., Khatami R., Werth E., Bassetti C.L.: Hypocretin (orexin) deficiency predicts severe objective excessive daytime sleepiness in narcolepsy with cataplexy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2006; 77: 402–404
- [10] Bayer L., Eggermann E., Serafin M., Saint-Mieux B., Machard D., Jones B., Muhlethaler M.: Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 2001; 14: 1571–1575
- [11] Berendse H.W., Groenewegen H.J.: Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J. Comp. Neurol.*, 1990; 299: 187–228
- [12] Berendse H.W., Groenewegen H.J.: Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience*, 1991; 42: 73–102
- [13] Beuckmann C.T., Sinton C.M., Williams S.C., Richardson J.A., Hammer R.E., Sakurai T., Yanagisawa M.: Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 4469–4477
- [14] Blouin A.M., Thannickal T.C., Worley P.F., Baraban J.M., Reti I.M., Siegel J.M.: Narp immunostaining of human hypocretin (orexin) neurons: loss in narcolepsy. *Neurology*, 2005; 65: 1189–1192
- [15] Boehmer L.N., Wu M.F., John J., Siegel J.M.: Treatment with immunosuppressive and anti-inflammatory agent delays onset of canine genetic narcolepsy and reduces symptom severity. *Exp. Neurol.*, 2004; 188: 292–299
- [16] Bourgin P., Huitron-Resendiz S., Spier A.D., Fabre V., Morte B., Criado J.R., Sutcliffe J.G., Henriksen S.J., de Lecea L.: Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 7760–7765
- [17] Broberger C., de Lecea L., Sutcliffe J.G., Hokfelt T.: Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells from distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J. Comp. Neurol.*, 1998; 402: 460–474
- [18] Brown R.E., Sergeeva O.A., Eriksson K.S., Haas H.L.: Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology*, 2001; 40: 457–459
- [19] Brown R.E., Sergeeva O.A., Eriksson K.S., Haas H.L.: Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *J. Neurosci.*, 2002; 22: 8850–8859
- [20] Burette S., Tyler C.J., Leonard C.S.: Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by hypocretin/orexin peptides: implication for wakefulness and narcolepsy. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 2862–2872
- [21] Chemelli R.M., Sinton C.M., Yanagisawa M.: Polysomnographic characterization of Orexin-2 receptor knockout mice. *Sleep*, 2000; 23(Suppl.): 296–297
- [22] Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., Yanagisawa M.: Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 1999; 98: 437–451
- [23] Chen C.T., Dun S.L., Kwok E.H., Dun N.J., Chang J.K.: Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, 1999; 260: 161–164
- [24] Chou T.C., Scammell T.E., Gooley J.J., Gaus S.E., Saper C.B., Lu J.: Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J. Neurosci.*, 2003; 23: 10691–10702
- [25] Ciriello J., Rosas-Arellano M.P., Solano-Flores L.P., de Oliveira C.V.: Identification of neurons containing orexin-B (hypocretin-2) immunoreactivity in limbic structures. *Brain Res.*, 2003; 967: 123–131

- [26] Crocker A., Espana R.A., Papadopoulou M., Saper C.B., Faraco J., Sakurai T., Honda M., Mignot E., Scammell T.E.: Concomitant loss of dynorphin, NARP, and orexin in narcolepsy. *Neurology*, 2005; 65: 1184–1188
- [27] Cutler D.J., Morris R., Sheridhar V., Wattam T.A., Holmes S., Patel S., Arch J.R., Wilson S., Buckingham R.E., Evans M.L., Leslie R.A., Williams G.: Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides*, 1999; 20: 1455–1470
- [28] Dalmau J., Graus F., Villarejo A., Posner J.B., Blumenthal D., Thiessen B., Saiz A., Meneses P., Rosenfeld M.R.: Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis. *Brain*, 2004; 127: 1831–1844
- [29] Date Y., Mondal M.S., Matsukura S., Nakazato M.: Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 2000; 288: 87–90
- [30] Date Y., Mondal M.S., Matsukura S., Ueta Y., Yamashita H., Kaiya H., Kangawa K., Nakazato M.: Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Mol. Brain Res.*, 2000; 76: 1–6
- [31] Date Y., Ueta Y., Yamashita H., Yamaguchi H., Matsukura S., Kangawa K., Sakurai T., Yanagisawa M., Nakazato M.: Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 748–753
- [32] Dauvilliers Y., Billiard M., Montplaisir J.: Clinical aspects and pathophysiology of narcolepsy. *Clin. Neurophysiol.*, 2003; 114: 2000–2017
- [33] de Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L., Gautvik V.T., Bartlett F.S. II, Frankel W.N., van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M., Sutcliffe J.G.: The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 322–327
- [34] de Lecea L., Sutcliffe J.G.: The hypocretins and sleep. *FEBS J.*, 2005; 272: 5675–5688
- [35] Desarnaud F., Murillo-Rodriguez E., Lin L., Xu M., Gerashchenko D., Shiromani S.N., Nishino S., Mignot E., Shiromani P.J.: The diurnal rhythm of hypocretin in young and old F344 rats. *Sleep*, 2004; 27: 851–856
- [36] Dyer C.J., Touchette K.J., Carroll J.A., Allee G.L., Matteri R.L.: Cloning of porcine prepro-orexin cDNA and effects of an intramuscular injection of synthetic porcine orexin-B on feed intake in young pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 1999; 16: 145–148
- [37] Ebrahim I.O., Sharief M.K., de Lacy S., Semra Y.K., Howard R.S., Kopelman M.D., Williams A.J.: Hypocretin (orexin) deficiency in narcolepsy and primary hypersomnia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2003; 74: 127–130
- [38] Edley S.M., Graybiel A.M.: The afferent and efferent connections of the feline nucleus tegmenti pedunculopontinus, pars compacta. *J. Comp. Neurol.*, 1983; 217: 187–215
- [39] Eggermann E., Serafin M., Bayer L., Machard D., Saint-Mieux B., Jones B.E., Muhlethaler M.: Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurons. *Neuroscience*, 2001; 108: 177–181
- [40] el Mansari M., Sakai K., Jouvett M.: Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp. Brain Res.*, 1989; 76: 519–529
- [41] Eriksson K.S., Sergeeva O., Brown R.E., Haas H.L.: Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J. Neurosci.*, 2001; 21: 9273–9279
- [42] Eriksson K.S., Sergeeva O.A., Selbach O., Haas H.L.: Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 2004; 19: 1278–1284
- [43] Fredriksson R., Lagerström M.C., Lundin L.G., Schiöth H.B.: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.*, 2003; 63: 1256–1272
- [44] Fujiki N., Yoshida Y., Ripley B., Mignot E., Nishino S.: Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog. *Sleep*, 2003; 26: 953–959
- [45] Gallopin T., Fort P., Eggermann E., Cauli B., Luppi P.H., Rossier J., Audinat E., Muhlethaler M., Serafin M.: Identification of sleep-promoting neurons *in vitro*. *Nature*, 2000; 404: 992–995
- [46] Gerashchenko D., Blanco-Centurion C., Greco M.A., Shiromani P.J.: Effects of lateral hypothalamic lesion with the neurotoxin hypocretin-2-saporin on sleep in Long-Evans rats. *Neuroscience*, 2003; 116: 223–235
- [47] Gerashchenko D., Kohls M.D., Greco M., Waleh N.S., Salin-Pascual R., Kilduff T.S., Lappi D.A., Shiromani P.J.: Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *J. Neurosci.*, 2001; 21: 7273–7283
- [48] Gledhill R.F., Bartel P.R., Yoshida Y., Nishino S., Scammell T.E.: Narcolepsy caused by acute disseminated encephalomyelitis. *Arch. Neurol.*, 2004; 61: 758–760
- [49] Greco M.A., Shiromani P.J.: Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2001; 88: 176–182
- [50] Hakansson M., de Lecea L., Sutcliffe J.G., Yanagisawa M., Meister B.: Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurons of the lateral hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.*, 1999; 11: 653–663
- [51] Hallanger A.E., Wainer B.H.: Ascending projections from the pedunculo-pontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1988; 274: 483–515
- [52] Hara J., Beuckmann C.T., Nambu T., Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M., Sakurai T.: Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 2001; 30: 345–354
- [53] Harrison T.A., Chen C.T., Dun N.J., Chang J.K.: Hypothalamic orexin A-immunoreactive neurons project to the rat dorsal medulla. *Neurosci. Lett.*, 1999; 273: 17–20
- [54] Herkenham M.: Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science*, 1980; 207: 532–535
- [55] Hoang Q.V., Bajic D., Yanagisawa M., Nakajima S., Nakajima Y.: Effects of orexin (hypocretin) on GIRK channels. *J. Neurophysiol.*, 2003; 90: 693–702
- [56] Holmqvist T., Åkerman K.E., Kukkonen J.P.: High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neurosci. Lett.*, 2001; 305: 177–180
- [57] Holmqvist T., Åkerman K.E., Kukkonen J.P.: Orexin signaling in recombinant neuron-like cells. *FEBS Lett.*, 2002; 526: 11–14
- [58] Holmqvist T., Johansson L., Östman L., Ammoun S., Åkerman K.E.O., Kukkonen J.P.: OX1 Orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 6570–6579
- [59] Hong S.C., Hayduk R., Lim J., Mignot E.: Clinical and polysomnographic features in DQB1\*0602 positive and negative narcolepsy patients: results from the modafinil clinical trial. *Sleep Med.*, 2000; 1: 33–39
- [60] Horvath T.L., Diano S., van den Pol A.N.: Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 1072–1087
- [61] Horvath T.L., Peyron C., Diano S., Ivanov A., Aston-Jones G., Kilduff T.S., van den Pol A.N.: Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J. Comp. Neurol.*, 1999; 415: 145–159
- [62] Hungs M., Fan J., Lin L., Lin X., Maki R.A., Mignot E.: Identification and functional analysis of mutations in the hypocretin (orexin) genes of narcoleptic canines. *Genome Res.*, 2001; 11: 531–539
- [63] John J., Wu M.F., Maidment N.T., Lam H.A., Boehmer L.N., Patton M., Siegel J.M.: Developmental changes in CSF hypocretin-1 (orexin-A) levels in normal and genetically narcoleptic Doberman pinschers. *J. Physiol.*, 2004; 560: 587–592
- [64] John J., Wu M.F., Siegel J.M.: Systemic administration of hypocretin-1 reduces cataplexy and normalizes sleep and waking durations in narcoleptic dogs. *Sleep Res. Online*, 2000; 3: 23–28
- [65] Kadotani H., Faraco J., Mignot E.: Genetic studies in the sleep disorder narcolepsy. *Genome Res.*, 1998; 8: 427–434
- [66] Karteris E., Chen J., Randeve H.S.: Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004; 89: 1957–1962
- [67] Kastin A.J., Akerstrom V.: Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999; 289: 219–223
- [68] Kilduff T.S., Peyron C.: The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders. *Trends Neurosci.*, 2000; 23: 359–365
- [69] Kirchgessner A.L.: Orexins in the brain-gut axis. *Endocr. Rev.*, 2002; 23: 1–15



- [70] Kohlmeier K.A., Inoue T., Leonard C.S.: Hypocretin/orexin peptide signaling in the ascending arousal system: elevation of intracellular calcium in the mouse dorsal raphe and laterodorsal tegmentum. *J. Neurophysiol.*, 2004; 92: 221–235
- [71] Korotkova T.M., Sergeeva O.A., Eriksson K.S., Haas H.L., Brown R.E.: Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J. Neurosci.*, 2003; 23: 7–11
- [72] Krahn L.E., Pankratz V.S., Oliver L., Boeve B.F., Silber M.H.: Hypocretin (orexin) levels in cerebrospinal fluid of patients with narcolepsy: relationship to cataplexy and HLA DQB1\*0602 status. *Sleep*, 2002; 25: 733–736
- [73] Kukkonen J.P., Åkerman K.E.: Orexin receptors couple to Ca<sup>2+</sup> channels different from store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuroreport*, 2001; 12: 2017–2020
- [74] Kukkonen J.P., Holmqvist T., Ammoun S., Åkerman K.E.: Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002; 283: C1567–C1591
- [75] Lambe E.K., Aghajanian G.K.: Hypocretin (orexin) induces calcium transients in single spines postsynaptic to identified thalamocortical boutons in prefrontal cortex. *Neuron*, 2003; 40: 139–150
- [76] Lammers G.J., Overeem S.: Pharmacological management of narcolepsy. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2003; 4: 1739–1746
- [77] Larsson K.P., Åkerman K.E., Magga J., Uotila S., Kukkonen J.P., Nasman J., Herzog K.H.: The STC-1 cells express functional orexin-A receptors coupled to CCK release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 309: 209–216
- [78] Lee M.G., Hassani O.K., Jones B.E.: Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 6716–6720
- [79] Lin L., Faraco J., Li R., Kadotani H., Rogers W., Lin X., Qiu X., de Jong P.J., Nishino S., Mignot E.: The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 1999; 98: 365–376
- [80] Lund P.E., Shariatmadari R., Uustare A., Detheux M., Parmentier M., Kukkonen J.P., Åkerman K.E.: The orexin OX1 receptor activates a novel Ca<sup>2+</sup> influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 30806–30812
- [81] Marcus J.N., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa M., Elmquist J.K.: Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 2001; 435: 6–25
- [82] Martinez G.S., Smale L., Nunez A.A.: Diurnal and nocturnal rodents show rhythms in orexinergic neurons. *Brain Res.*, 2002; 955: 1–7
- [83] Massaquoi S.G., McCarley R.W.: Extension of the limit cycle reciprocal interaction model of REM cycle control. An integrated sleep control model. *J. Sleep Res.*, 1992; 1: 138–143
- [84] Mazzocchi G., Malendowicz L.K., Aragona F., Rebuffat P., Gottardo L., Nussdorfer G.G.: Human pheochromocytomas express orexin receptor type 2 gene and display an *in vitro* secretory response to orexins A and B. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 4818–4821
- [85] Mieda M., Willie J.T., Hara J., Sinton C.M., Sakurai T., Yanagisawa M.: Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 4649–4654
- [86] Mignot E.: Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology*, 1998; 50: S16–S22
- [87] Mignot E., Hayduk R., Black J., Grumet F.C., Guilleminault C.: HLA DQB1\*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep*, 1997; 20: 1012–1020
- [88] Mignot E., Lammers G.J., Ripley B., Okun M., Nevsimalova S., Overeem S., Vankova J., Black J., Harsh J., Bassetti C., Schrader H., Nishino S.: The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch. Neurol.*, 2002; 59: 1553–1562
- [89] Mignot E., Lin L., Rogers W., Honda Y., Qiu X., Lin X., Okun M., Hohjoh H., Miki T., Hsu S., Leffell M., Grumet F., Fernandez-Vina M., Honda M., Risch N.: Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001; 68: 686–699
- [90] Mignot E., Nishino S.: Emerging therapies in narcolepsy-cataplexy. *Sleep*, 2005; 28: 754–763
- [91] Mignot E., Taheri S., Nishino S.: Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat. Neurosci.*, 2002; 5(Suppl.): 1071–1075
- [92] Mignot E., Wang C., Rattazzi C., Gaiser C., Lovett M., Guilleminault C., Dement W.C., Grumet F.C.: Genetic linkage of autosomal recessive canine narcolepsy with a  $\mu$  immunoglobulin heavy-chain switch-like segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 3475–3478
- [93] Mileykovskiy B.Y., Kiyashchenko L.I., Siegel J.M.: Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, 2005; 46: 787–798
- [94] Mochizuki T., Crocker A., McCormack S., Yanagisawa M., Sakurai T., Scammell T.E.: Behavioral state instability in orexin knock-out mice. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 6291–6300
- [95] Mochizuki T., Klerman E.B., Sakurai T., Scammell T.E.: Elevated body temperature during sleep in orexin knockout mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2006; 291: R533–R540
- [96] Mondal M.S., Nakazato M., Date Y., Murakami N., Hanada R., Sakata T., Matsukura S.: Characterization of orexin-A and orexin-B in the microdissected rat brain nuclei and their contents in two obese rat models. *Neurosci. Lett.*, 1999; 273: 45–48
- [97] Mondal M.S., Nakazato M., Date Y., Murakami N., Yanagisawa M., Matsukura S.: Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 256: 495–499
- [98] Nambu T., Sakurai T., Mizukami K., Hosoya Y., Yanagisawa M., Goto K.: Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.*, 1999; 827: 243–260
- [99] Nishino S., Kanbayashi T.: Symptomatic narcolepsy, cataplexy and hypersomnia, and their implications in the hypothalamic hypocretin/orexin system. *Sleep Med. Rev.*, 2005; 9: 269–310
- [100] Nishino S., Ripley B., Overeem S., Lammers G.J., Mignot E.: Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet*, 2000; 355: 39–40
- [101] Nishino S., Ripley B., Overeem S., Nevsimalova S., Lammers G.J., Vankova J., Okun M., Rogers W., Brooks S., Mignot E.: Low cerebrospinal fluid hypocretin (Orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy. *Ann. Neurol.*, 2001; 50: 381–388
- [102] Orellana C., Villemin E., Tafti M., Carlander B., Besset A., Billiard M.: Life events in the year preceding the onset of narcolepsy. *Sleep*, 1994; 17(Suppl.8): S50–S53
- [103] Overeem S., Dalmau J., Bataller L., Nishino S., Mignot E., Verschuuren J., Lammers G.J.: Hypocretin-1 CSF levels in anti-Ma2 associated encephalitis. *Neurology*, 2004; 62: 138–140
- [104] Overeem S., Mignot E., van Dijk J.G., Lammers G.J.: Narcolepsy: clinical features, new pathophysiologic insights, and future perspectives. *J. Clin. Neurophysiol.*, 2001; 18: 78–105
- [105] Pace-Schott E.F., Hobson J.A.: The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2002; 3: 591–605
- [106] Peyron C., Faraco J., Rogers W., Ripley B., Overeem S., Charnay Y., Nevsimalova S., Aldrich M., Reynolds D., Albin R., Li R., Hungs M., Pedrazzoli M., Padigaru M., Kucherlapati M., Fan J., Maki R., Lammers G.J., Bouras C., Kucherlapati R., Nishino S., Mignot E.: A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat. Med.*, 2000; 6: 991–997
- [107] Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G., Kilduff T.S.: Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 1998; 18: 9996–10015
- [108] Putney J.W. Jr.: Formation and actions of calcium-mobilizing messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate. *Am. J. Physiol.*, 1987; 252: G149–G157
- [109] Randevo H.S., Karteris E., Grammatopoulos D., Hillhouse E.W.: Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 4808–4813
- [110] Reti I.M., Reddy R., Worley P.F., Baraban J.M.: Selective expression of Narp, a secreted neuronal pentraxin, in orexin neurons. *J. Neurochem.*, 2002; 82: 1561–1565
- [111] Ripley B., Fujiki N., Okura M., Mignot E., Nishino S.: Hypocretin levels in sporadic and familial cases of canine narcolepsy. *Neurobiol. Dis.*, 2001; 8: 525–534
- [112] Ripley B., Overeem S., Fujiki N., Nevsimalova S., Uchino M., Yesavage J., Di Monte D., Dohi K., Melberg A., Lammers G.J., Nishida Y., Roelandse F.W., Hungs M., Mignot E., Nishino S.: CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology*, 2001; 57: 2253–2258



- [113] Rogers A.E., Meehan J., Guilleminault C., Grumet F.C., Mignot E.: HLA DR15 (DR2) and DQB1\*0602 typing studies in 188 narcoleptic patients with cataplexy. *Neurology*, 1997; 48: 1550–1556
- [114] Rye D.B., Saper C.B., Lee H.J., Wainer B.H.: Pedunclopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J. Comp. Neurol.* 1987; 259: 483–528
- [115] Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M.: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 1998; 92: 573–585
- [116] Sakurai T., Moriguchi T., Furuya K., Kajiwara N., Nakamura T., Yanagisawa M., Goto K.: Structure and function of human prepro-orexin gene. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 17771–17776
- [117] Salomon R.M., Ripley B., Kennedy J.S., Johnson B., Schmidt D., Zeitzer J.M., Nishino S., Mignot E.: Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol. Psychiatry*, 2003; 54: 96–104
- [118] Saper C.B., Chou T.C., Scammell T.E.: The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.*, 2001; 24: 726–731
- [119] Savaskan E., Muller-Spahn F., Meier F., Wirz-Justice A., Meyer P.: Orexins and their receptors in the human retina. *Pathobiology*, 2004; 71: 211–216
- [120] Schwartz J.R., Feldman N.T., Fry J.M., Harsh J.: Efficacy and safety of modafinil for improving daytime wakefulness in patients treated previously with psychostimulants. *Sleep Med.*, 2003; 4: 43–49
- [121] Selbach O., Doreulee N., Bohla C., Eriksson K.S., Sergeeva O.A., Poelchen W., Brown R.E., Haas H.L.: Orexins/hypocretins cause sharp wave- and theta-related synaptic plasticity in the hippocampus via glutamatergic, gabaergic, noradrenergic, and cholinergic signaling. *Neuroscience*, 2004; 127: 519–528
- [122] Selbach O., Eriksson K.S., Haas H.L.: Drugs to interfere with orexins (hypocretins). *Drug News Perspect.*, 2003; 16: 669–681
- [123] Selbach O., Haas H.L.: Hypocretins: the timing of sleep and waking. *Chronobiol. Int.*, 2006; 23: 63–70
- [124] Siegel J.M.: Hypocretin (orexin): Role in normal behavior and neuropathology. *Ann. Rev. Psychol.*, 2004; 55: 125–148
- [125] Smart D., Jerman J.C., Brough S.J., Rushton S.L., Murdock P.R., Jewitt F., Elshourbagy N.A., Ellis C.E., Middlemiss D.N., Brown F.: Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *Br. J. Pharmacol.*, 1999; 128: 1–3
- [126] Steininger T.L., Alam M.N., Gong H., Szymusiak R., McGinty D.: Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Res.*, 1999; 840: 138–147
- [127] Strecker R.E., Morairty S., Thakkar M.M., Porkka-Heiskanen T., Basheer R., Dauphin L.J., Rainnie D.G., Portas C.M., Greene R.W., McCarley R.W.: Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav. Brain Res.* 2000; 115: 183–204
- [128] Szymusiak R., Alam N., Steininger T.L., McGinty D.: Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res.*, 1998; 803: 178–188
- [129] Tafti M., Nishino S., Aldrich M.S., Liao W., Dement W.C., Mignot E.: Major histocompatibility class II molecules in the CNS: increased microglial expression at the onset of narcolepsy in canine model. *J. Neurosci.*, 1996; 16: 4588–4595
- [130] Taheri S., Zeitzer J.M., Mignot E.: The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2002; 25: 283–313
- [131] Takahashi K., Koyama Y., Kayama Y., Yamamoto M.: Effects of orexin on the laterodorsal tegmental neurones. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 2002; 56: 335–336
- [132] Thakkar M.M., Strecker R.E., McCarley R.W.: Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 5490–5497
- [133] Thannickal T.C., Moore R.Y., Nienhuis R., Ramanathan L., Gulyani S., Aldrich M., Cornford M., Siegel J.M.: Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 2000; 27: 469–474
- [134] Thannickal T.C., Siegel J.M., Nienhuis R., Moore R.Y.: Pattern of hypocretin (orexin) soma and axon loss, and gliosis, in human narcolepsy. *Brain Pathol.*, 2003; 13: 340–351
- [135] Trivedi P., Yu H., MacNeil D.J., Van der Ploeg L.H., Guan X.M.: Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett.*, 1998; 438: 71–75
- [136] Uramura K., Funahashi H., Muroya S., Shioda S., Takigawa M., Yada T.: Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroreport*, 2001; 12: 1885–1889
- [137] van den Pol A.N.: Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 3171–3182
- [138] van den Pol A.N., Gao X.B., Obrietan K., Kilduff T.S., Belousov A.B.: Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 7962–7971
- [139] van den Pol A.N., Patrylo P.R., Ghosh P.K., Gao X.B.: Lateral hypothalamus: early developmental expression and response to hypocretin (orexin). *J. Comp. Neurol.*, 2001; 433: 349–363
- [140] Vidal L., Blanchard J., Morin L.P.: Hypothalamic and zona incerta neurons expressing hypocretin, but not melanin concentrating hormone, project to the hamster intergeniculate leaflet. *Neuroscience*, 2005; 134: 1081–1090
- [141] von Economo C.: Sleep as a problem of localization. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 1930; 71: 249–259
- [142] Walacik E., Michalak G.: Narkolepsja – aktualny stan wiedzy i perspektywy. *Sen*, 2004; 4: 55–70
- [143] Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Tokita S., Williams S.C., Kisanuki Y.Y., Marcus J.N., Lee C., Elmquist J.K., Kohlmeier K.A., Leonard C.S., Richardson J.A., Hammer R.E., Yanagisawa M.: Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*, 2003; 38: 715–730
- [144] Willie J.T., Renthall W., Chemelli R.M., Miller M.S., Scammell T.E., Yanagisawa M., Sinton C.M.: Modafinil more effectively induces wakefulness in orexin-null mice than in wild-type littermates. *Neuroscience*, 2005; 130: 983–995
- [145] Xi M., Morales F.R., Chase M.H.: Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res.*, 2001; 901: 259–264
- [146] Xu R., Wang Q., Yan M., Hernandez M., Gong C., Boon W.C., Murata Y., Ueta Y., Chen C.: Orexin-A augments voltage-gated Ca<sup>2+</sup> currents and synergistically increases growth hormone (GH) secretion with GH-releasing hormone in primary cultured ovine somatotropes. *Endocrinology*, 2002; 143: 4609–4619
- [147] Yamanaka A., Tsujino N., Funahashi H., Honda K., Guan J.L., Wang Q.P., Tominaga M., Goto K., Shioda S., Sakurai T.: Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 290: 1237–1245
- [148] Yoshida Y., Fujiki N., Nakajima T., Ripley B., Matsumura H., Yoneda H., Mignot E., Nishino S.: Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur. J. Neurosci.*, 2001; 14: 1075–1081
- [149] Yoshikawa S., Suzuki S., Kanbayashi T., Nishino S., Tamai H.: Hypersomnia and low cerebrospinal fluid hypocretin levels in acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatr. Neurol.*, 2004; 31: 367–370
- [150] Zeitzer J.M., Buckmaster C.L., Parker K.J., Hauck C.M., Lyons D.M., Mignot E.: Circadian and homeostatic regulation of hypocretin in a primate model: implications for the consolidation of wakefulness. *J. Neurosci.*, 2003; 23: 3555–3560
- [151] Zeitzer J.M., Nishino S., Mignot E.: The neurobiology of hypocretins (orexins), narcolepsy and related therapeutic interventions. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2006; 27: 368–374
- [152] Zhang S., Zeitzer J.M., Yoshida Y., Wisor J.P., Nishino S., Edgar D.M., Mignot E.: Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. *Sleep*, 2004; 27:619–627

