

MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS AS TARGETS FOR DRUG DEVELOPMENT

MUSKARINSKI ACETILHOLINSKI RECEPTORI KAO CILJNO MESTO ZA RAZVOJ LEKOVA

Maja Stojković¹, Dragana Protić¹, Saša Trailović²

¹Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Institut za farmakologiju i toksikologiju, Beograd, Srbija

Correspondence: maja.stojkovic@med.bg.ac.rs

Abstract

Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) are a subfamily of G protein-coupled receptors that have been identified as promising targets for drug development. Five different mAChR subtypes regulate various fundamental functions. In the central nervous system (CNS), they play a crucial role in regulating numerous cognitive, behavioral, and autonomic functions. Outside the CNS, they facilitate the effects of acetylcholine in organs and tissues innervated by parasympathetic nerves, participating in various vegetative functions such as regulating heart rate, smooth muscle contraction, and glandular secretion. The disruption in cholinergic signalling contributes to several pathophysiological conditions and diseases. Thus, muscarinic agonists and antagonists have a wide therapeutic potential in the treatment of neuropsychiatric disorders, such as Alzheimer's disease, schizophrenia or pain, and also in diseases like COPD and incontinence. Activation of different mAChR with selective ligands could be beneficial for treating the above-mentioned diseases while avoiding side effects. Clinical trials targeting mAChRs have shown promising results, with several compounds demonstrating efficacy and better tolerability profiles. However, developing drugs targeting mAChR still presents challenges, primarily due to the high homology in the structure of the orthosteric binding site. The recent insights into the physiology, pharmacology, and structure of mAChRs have provided opportunities for the development of novel drugs targeting these receptors, including allosteric modulators. Allosteric modulators offer the advantage of selective binding mAChR, potentially enhancing therapeutic efficacy while minimizing off-target effects.

Keywords:

muscarinic receptors,
drug development,
allosteric modulators

In conclusion, mAChRs represent promising targets for drug development. Further research and clinical trials are needed to develop effective therapies targeting muscarinic receptors for various diseases.

Sažetak

Muskarinski acetilholinski receptori (mAChR) pripadaju porodici receptora vezanih za G-protein koji predstavljaju veoma važno ciljno mesto za razvoj lekova. Pet različitih podtipova mAChR regulišu brojne vitalne funkcije. U centralnom nervnom sistemu (CNS) igraju ključnu ulogu u regulisanju brojnih kognitivnih, bihevioralnih i autonomnih funkcija. Van CNS-a uključeni su u posredovanje efekata acetilholina u parasimpatički inervisanim organima i regulaciji različitih vegetativnih funkcija, kao što su srčana frekvencija, kontrakcija glatkih mišića i lučenje žlezda. Poremećaj holinergičke transmisije dovodi do različitih patofizioloških stanja i bolesti. Stoga, muskarinski agonisti i antagonisti imaju širok terapijski potencijal u lečenju neuropsihijatrijskih poremećaja, kao što su: Alchajmerova bolest, shizofrenija ili bol, kao i bolesti poput hronične opstruktivne bolesti pluća i inkontinencije. Modulacija različitih mAChR sa selektivnim ligandima može biti korisna za lečenje gore navedenih bolesti, uz izbegavanje neželjenih efekata. Klinička ispitivanja usmerena na mAChR pokazala su obećavajuće rezultate sa nekoliko jedinjenja visoke efikasnosti i dobre podnošljivosti. Međutim, razvoj lekova koji ciljaju mAChR i dalje predstavlja izazov, pre svega zbog visoke homologije u strukturi ortosternog vezivnog mesta. Nedavna saznanja iz fiziologije, farmakologije i strukture mAChR pružila su mogućnosti za razvoj novih lekova koji ciljaju ove receptore, uključujući alosterne modulatori. Alosterni modulatori se selektivnije vezuju za određeni podtip mAChR i povećavaju terapijsku efikasnost, uz minimalnu aktivaciju drugih podtipova receptora i izazivanje neželjenih efekata.

Ključne reči:

muskarinski receptori,
razvoj lekova,
alosterni modulatori

U zaključku, mAChR predstavljaju obećavajuća ciljna mesta za razvoj lekova. Potrebna su dalja istraživanja i klinička ispitivanja kako bi se razvile efikasne supstance koje deluju preko mAChR za terapiju različitih bolesti.

Uvod

Muskarinski acetilholinski receptori (mAChR) pripadaju porodici receptora vezanih za G-protein (engl. *G-protein coupled receptors* - GPCR) koji imaju važnu ulogu u posredovanju efekata acetilholina (ACh) i regulisanju vitalnih fizioloških funkcija (1). Pored toga, izmenjena holinergička transmisija nalazi se u osnovi mnogih bolesti. Više od trećine lekova koji se trenutno nalaze na tržištu svoje dejstvo ostvaruje preko GPCR, pa stoga GPCR predstavljaju atraktivne mete za dizajn novih lekova (2). Zbog nedavnog napretka u razumevanju strukture, fiziologije i farmakologije mAChR, ovi receptori su se ponovo našli u fokusu interesovanja brojnih naučnika (1). Sintaza visokoselektivnih lekova za određeni tip mAChRs može imati veliki potencijal za razvoj novih lekova.

Cilj ovog mini preglednog članka jeste sveobuhvatni prikaz mAChR kao potencijalnog ciljnog mesta preko kojeg lekovi mogu da ispoljavaju svoja željena i neželjena dejstva. Ovakav prikaz treba da omogući sagledavanje značajnosti mAChR u planiranju budućih farmakoloških ispitivanja.

Metod

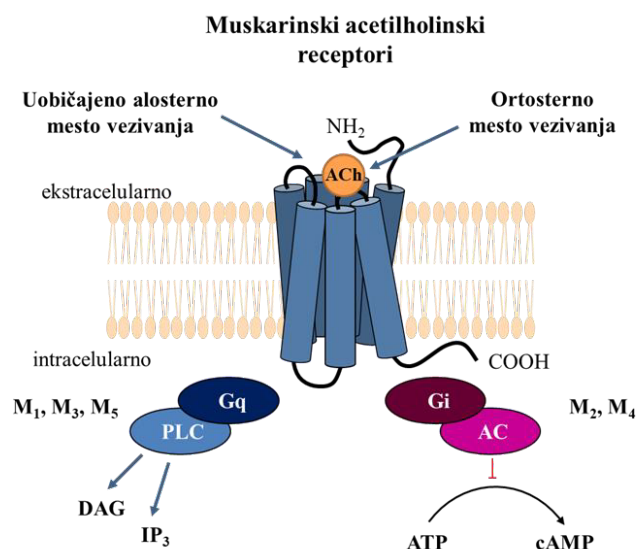
Za izradu ovog mini preglednog rada podaci su prikupljeni pretraživanjem PubMed, MEDLINE i Google Scholar baza podataka, sa posebnim fokusom na poslednje četiri godine. Ključne reči korišćene za pretragu bile su: *pharmacological effects OR pharmacology OR drug development OR drug targeting AND muscarinic receptors OR muscarinic agonists OR muscarinic antagonists*.

Pregled literature

Struktura, podela i lokalizacija muskarinskih receptora

Identifikovano je pet različitih podtipova mAChR (M1–M5), kodiranih genima *CHRM1-CHRM5* (3). Kao i svi GPCR, mAChR su sačinjeni od sedam transmembranskih (TM) heliksa (označenih TM1 do TM7), povezanih sa tri intracelularne (engl. *intracellular loop*, IL1 - IL3) i tri ekstracelularne petlje (engl. *extracellular loop*, EL1 - EL3) (3). Na ekstracelularnoj strani nalazi se karakteristični N-kraj, a na intracelularnoj C-kraj (4). U tercijarnoj strukturi receptora, koja podseća na bure, transmembranski heliksi formiraju hidrofilni džep, dostupan sa ekstraćelijske strane ćelijske membrane (5). Ovaj hidrofilni džep predstavlja evolutivno očuvano ortosterno mesto za koje se vezuju endogeni agonisti (npr. ACh), kao i supstance koje imaju agonističko (npr. betanhol) i antagonističko (npr. atropin) dejstvo na nivou mAChR (4). Pored ortosternog, mAChR poseduju minimum jedno alosterno mesto za koje se vezuju mali alosterni modulatori, koji utiču na afinitet i efikasnost ortosternih liganda (6) (**slika 1**).

Nakon vezivanja agonista, mAChR ostvaruju svoje funkcije kaskadnom aktivacijom sekundarnih glasnika povezanih sa određenim klasama G-proteina. U zavisnosti od klase G-proteina, mAChR posreduju u različitim ćelijskim odgovorima (8). Podtipovi M1, M3 i M5 aktiviraju fosfolipazu C preko Gq/11, dok receptori M2 i M4 aktiviraju Gi protein koji inhibira aktivnost adenil ciklaze i time sintezu cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) preko Gi/o (3).



Slika 1. Struktura muskarinskih acetilholinskih receptora.

Adaptirano prema (7). Ach – acetilholin; M – muskarinski receptor; G – G-protein; PLC – fosfolipaza C; AC – adenilatna ciklaza; DAG – diacil glicerol; IP₃ – inozitol trifosfat; ATP – adenozin trifosfat; cAMP – ciklični adenozin monofosfat

Muskarinski receptori su uključeni u prenos holinerških signala u centralnom nervnom sistemu (CNS), autonomnim ganglijama, glatkim mišićima i drugim parasimpatički inervisanim organima (9). Prisutni su i na pojedinim tkivima i organima koji nisu parasimpatički inervisani (npr. krvni sudovi, znojne žlezde) (10).

Podtipovi mAChR različito su eksprimirani u različitim tkivima i organima (1). Tako se M1 receptori predominantno nalaze u hipokampusu, moždanoj kori, želucu i pljuvačnim žlezdama (11), a M2 receptori se nalaze u CNS-u i periferno u pretkomorima i sprovodnom sistemu srca (9). Predominantan tip mAChR u glatkim mišićima (npr. bronhije, creva i zenica), egzokrinim žlezdama i endotelnim ćelijama je M3 (12), koji se nalazi i u krvnim sudovima koji nemaju parasimpatičku inervaciju, kao i u znojnim žlezdama koje su pod kontrolom simpatikusa (10). Receptori M4 i M5 se nalaze u CNS-u: u korteksu, hipokampusu i u supstanciji nigri, a smatra se da su uključeni u proces oslobađanja dopamina (13). Većina ćelija u organizmu poseduje više od jednog tipa mAChR (14).

Fiziološke funkcije muskarinskih receptora

Razumevanje funkcije podtipova mAChR otežao je nedostatak selektivnih agonista i antagonista (7). Početkom ovog veka, studije sprovedene na genetski modifikovanim (tzv. *knockout*) miševima, kojima je nedostajao jedan ili više gena za mAChR, doprinele su boljem razumevanju uloga podtipova mAChR (1). Tumačenje rezultata bilo je, međutim, izazovno zbog ekspresije više podtipova mAChR u tkivima i ćelijama. Kreiranje „*conditional knockout*“ miševa, kod kojih specifični podtipovi mAChR nedostaju samo u određenim ćelijama, kao i mAChR „*knock-in*“ miševa, kod kojih su geni koji kodiraju M3 ili M4 receptor (*CHRM3* ili *CHRM4*) zamenjeni mutiranim verzijama, dovelo je do boljeg razumevanja fiziologije pojedinačnog

podtipa mAChR, kao i njihove uloge u razvoju oboljenja (1).

S obzirom na distribuciju pojedinačnih podtipova mAChR i aktivaciju različitih signalnih puteva, ovi receptori igraju važnu ulogu u širokom spektru fizioloških funkcija u centralnom i perifernom nervnom sistemu (11). U skladu sa lokalizacijom u prednjem mozgu, M1 receptori imaju važnu ulogu u procesima učenja i pamćenja (11). Centralno lokalizovani, presinaptički, inhibitorni M2 receptori imaju važnu ulogu u regulaciji holinerškičke i dopaminergičke transmisije (15). Aktivacija perifernih M2 receptora u srcu dovodi do negativnog hronotropnog i inotropnog efekta (9). Receptor M2 je predominantan tip u srčanom mišiću, ali se zna da to nije jedini podtip (16). Receptori M1 i M3 takođe učestvuju u parasimpatičkoj regulaciji srčane funkcije (16). Zajedno sa M3, M2 receptori igraju važnu ulogu u kontrakciji glatkih mišića (17) dok M3 receptori predstavljaju glavni tip receptora u parasimpatički inervisanim organima i uključeni su u mnoge vegetativne procese, kao što su kontrakcija glatkih mišića (respiratornog, genitourinarnog i gastrointestinalnog trakta) i sekrecija egzokrinih žlezda (17). Centralni M4 receptori su uključeni u proces oslobađanja dopamina, kao i drugih neurotransmitera (18). Takođe, M2 i M4 receptori u kičmenoj moždini imaju važnu ulogu u spinalnoj holinerškičkoj kontroli nocicepcije (13). Aktivacija ovih mAChR dovodi do oslobađanja endogenih opioda, smanjenog oslobađanja neurotransmitera uključenih u prenos bola i inhibicije nociceptivne transmisije (13). Receptori M5 učestvuju u regulaciji oslobađanja dopamina, kao i do azot-monoksidom (NO) posredovane cerebralne vazodilatacije (19). Pored neurotransmiterskih, mAChR učestvuju i u regulaciji bazičnih ćelijskih funkcija, kao što su proliferacija, rast, diferencijacija i migracija ćelija i apoptoza (13). Lokalizacija i funkcija podtipova mAChR prikazane su u **tabeli 1**.

Uloga podtipova muskarinskih receptora u razvoju bolesti i terapijski potencijal

Poremećaj muskarinske signalizacije nalazi se u osnovi raznih oboljenja. Pored toga, poznato je da muskarinski modulatori imaju širok terapijski potencijal u lečenju bolesti koje nastaju kao posledica izmenjene parasimpatičke transmisije (13). U nastavku sledi prikaz mAChR kao ciljnog mesta u terapiji simptoma koji su deo kliničke slike stanja u čijoj patofiziološkoj osnovi postoji poremećaj holinerškičke transmisije.

Uloga muskarinskih receptora u patogenezi neuropsihijatrijskih poremećaja

Poznato je da je holinerškička transmisija znatno smanjena u bolestima praćenim kognitivnim propadanjem, kao što su demencija, Alchajmerova bolest i shizofrenija (20). Aktivacija M1 receptora poboljšava pamćenje i usporava kognitivni pad, pa je selektivni M1 agonizam jedan od terapijskih pristupa u lečenju ovih bolesti (21).

Tabela 1. Lokalizacija i funkcija podtipova muskarinskih acetilholinskih receptora

Podtip receptora	Lokalizacija	Fiziološke uloge	Uloga u patofiziološkoj osnovi poremećaja
M ₁	CNS (neokorteks, hipokampus, neostriatum), autonomne ganglije, želudac (žlezdane ćelije)	Kognitivne funkcije (učenje i pamćenje) Inhibicija oslobađanja dopamina Depolarizacija autonomnih ganglija Želudačna sekrecija HCl	Alchajmerova bolest, shizofrenija, kognitivna disfunkcija
M ₂	Široka rasprostranjenost u CNS-u (talamus, autoinhibitorni receptori u hipotalamusu i moždanom korteksu), srce (sprovodni sistem, pretkomore), glatki mišići	CNS: neuralna inhibicija, analgezija, hipotermija Srce: usporena depolarizacija i sprovođenje kroz AV i SA čvor, smanjena snaga kontrakcije pretkomore; Glatki mišići: kontrakcija	Kognitivna disfunkcija, bol
M ₃	Glatke mišićne ćelije i egzokrine žlezde, niska ekspresija u CNS-u	Glatke mišićne ćelije: kontrakcija (npr. bronh, mokraćna bešika); Egzokrine žlezde: sekrecija	Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP), urinarna inkontinencija, sindrom iritabilnog kolona
M ₄	Visoko zastupljeni u CNS-u (neokorteks, hipokampus, neostriatum), auto- i heteroinhibitorni receptori	CNS: inhibicija oslobađanja neurotransmisera, analgezija, facilitacija oslobađanja dopamina	Shizofrenija, neuropatski bol
M ₅	Supstancija nigra (<i>Substantia nigra</i>)	Oslobađanje dopamina, vazodilatacija	Zavisnost od psihoaktivnih supstanci

Prve studije sa M1 agonistima (pilocarpinom, arekolinom, RS-86) za poremećaje kognitivnih funkcija nisu bile obećavajuće zbog niske efikasnosti i pojave neželjenih efekata (21). Nakon brojnih pokušaja, sintetisan je ksanomelin, M1/M4 selektivni agonista, koji je u kliničkoj studiji doveo do dozno zavisnog poboljšanja kognitivnih funkcija kod obolelih od Alchajmerove bolesti (21). Studije sa ksanomelinom kod pacijenata sa Alchajmerovom bolešću dovele su do slučajnog otkrića: ksanomelin je doveo do poboljšanja psihotičnih simptoma kao što su deluzije i halucinacije. Nakon toga su sprovedene studije na obolelima od shizofrenije i ksanomelin je pokazao veliki potencijal u lečenju pozitivnih, negativnih i kognitivnih simptoma (18). Nažalost, studije su obustavljene zbog izraženih neželjenih efekata (pojačana salivacija, znojenje, gastrointestinalni poremećaji), koji su prevashodno posledica aktivacije perifernih M3 receptora (22). Uprkos obećavajućim prokognitivnim i antipsihotičnim efektima, klinički razvoj ksanomelina je bio pauziran decenijama zbog izraženih neželjenih efekata. Kako bi se izbegli holinergički neželjeni efekti, nedavno je načinjen kombinovan preparat ksanomelina i tropisijuma, neselektivnog mAChR antagonista sa ograničenim prolaskom kroz krvno-moždanu barijeru, nazvan KarTX (23,24). Skoro su publikovani rezultati III faze randomizovane, dvostruko slepe, placebo kontrolisane studije sa KarTX kod ispitanika sa dijagnozom shizofrenije (25). Preparat KarTX se pokazao efikasnim u smanjenju pozitivnih i negativnih simptoma shizofrenije, sa generalno dobrom podnošljivošću (25). Ovi rezultati ukazuju da KarTX može biti predstavnik nove klase efikasnih i dobro podnošljivih antipsihotika, koji deluju aktivacijom mAChR, različito od mehanizma postojećih antipsihotika koji blokiraju D2 receptor (25). Iako ne postoji dovoljno studija o modulaciji M5 receptora, dostupni su podaci koji sugerišu da M5 mogu biti od velike važnosti za lečenje

negativnih simptoma u shizofreniji (20). Pokazano je i da ovi receptori mogu biti bitna meta za dejstvo lekova koji se primenjuju u lečenju bolesti zavisnosti od psihoaktivnih supstanci (24).

Uloga muskarinskih receptora u centralnoj kontroli bola

Selektivni antagonisti M2 receptora, AFDX-116, metohramin i AQRA-741 dovode do izražene antinocipepcije na animalnim modelima bola (26). Takođe, ksanomelin dovodi do analgetičkih efekata na animalnim modelima inflamatornog i neuropatskog bola, a primena mAChR antagonista dovodi do izostanka ovog odgovora (27). Postojanje selektivnih agonista M2 i M4 receptora može biti korisno za postizanje adekvatne analgezije u terapiji bolnih sindroma (27).

Uloga muskarinskih receptora u patogenezi respiratornih oboljenja

Dobro je poznato da mAChR igraju važnu ulogu u patofiziologiji hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) (28). Pojačana parasimpatička, holinergička transmisija dovodi do bronhokonstrikcije i povećanog lučenja mukusa, ograničavajući protok vazduha i pogoršavajući respiratorne simptome (28). Antagonisti M3 receptora, kao što su ipratropijum i tiotropijum, pored β 2-agonista i inhalatornih kortikosteroida, već decenijama predstavljaju osnovu farmakološkog lečenja pacijenata sa stabilnom HOBP (28). Američka Agencija za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration* - FDA) odobrila je upotrebu revefenacina (TD-4208), inhalatornog dugodelujućeg antagonista mAChR, visokoselektivnog za M3 receptore u terapiji HOBP (29). Iako se ovi lekovi generalno dobro podnose, uobičajeni neželjeni, antimuskarinski efekti uključuju: suvoću

usta, konstipaciju, zamagljen vid i retenciju urina. Incidencija kardiovaskularnih neželjenih efekata i velikih neželjenih kardiovaskularnih događaja u kliničkim studijama sa tiotropijumom i revefenacinom je niska (28,29).

Uloga muskarinskih receptora u patogenezi urogenitalnih poremećaja

Disfunkcija mAChR na glatkom mišiću mokraćne bešike dovodi do sindroma hiperaktivne bešike, koji se karakteriše prekomernom stimulacijom i pojačanom kontrakcijom bešike (12). Antimuskarinski lekovi (npr. oksibutinin i tolterodin) u širokoj su upotrebi za lečenje ovog sindroma (23). Ovi lekovi dejstvo ostvaruju antagonizovanjem mAChR, prevashodno M3 receptora koji je odgovoran za kontrakciju glatkog mišića mokraćne bešike (30). Postoje dokazi da antimuskarinski lekovi kod starijih pacijenata povećavaju kognitivna oštećenja i rizik od demencije, pa se savetuje primena lekova koji ne prolaze krvno-moždanu barijeru (30).

Uloga muskarinskih receptora u patogenezi gastrointestinalnih poremećaja

Muskarinski acetilholinski receptori predstavljaju farmakološke mete za lečenje poremećaja crevnog motiliteta (17). Antagonisti M3 receptora su korisni u lečenju stanja kao što su sindrom iritabilnog kolona, koji se karakteriše prekomernom pokretljivošću creva (31). Dodatno, mAChR su bitni za procese homeostaze crevnog epitela i važno su mesto dejstva lekova u terapiji inflamatornih bolesti creva (31).

Uloga muskarinskih receptora u patogenezi kardiovaskularnih bolesti

Aktivacija M3 receptora ima protektivnu ulogu kod srčane hipertrofije indukovane angiotenzinom II, atrijske fibrilacije i ishemijskog oštećenja miokarda (32). Primena betanehola, muskarinskog agonista, na modelu kardiotoksičnosti izazvane doksorubicinom kod pacova, dovodi do poboljšanja srčane funkcije (33). Pored toga, studije na zebrecama (*Brachydanio rerio*) pokazuju da tolterodin, mAChR antagonist, dovodi do transkripcionih promena u kardiomiocitima, ukazujući na potencijalnu korist antagonista mAChR u terapiji poremećaja ritma (34). Osim atropina, koji se koristi za terapiju bradikardije, nisu razvijeni selektivni ligandi za terapiju bolesti kardiovaskularnog sistema (35). Štaviše, neki od postojećih antagonista, kao što je tiotropijum, mogu dovesti do oštećenja kardiomiocita (36).

Uloga muskarinskih receptora u nastanku oftalmoloških poremećaja

U oftalmologiji, agonisti i antagonisti mAChR se koriste za lečenje stanja kao što su glaukom i sindrom suvog oka (37).

Izazovi u razvoju lekova koji ciljaju muskarinske receptore i mehanizmi za prevazilaženje

Pri razvoju novih lekova, najveći izazov predstavlja postizanje selektivnosti za određeni podtip mAChR kako bi se postigli terapijski, a izbegli neželjeni efekti (4). Visoka homologija u strukturi ortosternog mesta među podtipovima mAChR ograničila je razvoj selektivnih agonista i antagonista mAChR (8). Nepotpuna selektivnost dovela je do ograničenog terapijskog uspeha mnogih agonista mAChR dizajniranih za lečenje bolesti CNS-a (24). Kardiovaskularni i gastrointestinalni neželjeni efekti, koji su bili razlog obustave kliničkih studija, uglavnom su posledica aktivacije perifernih M2 i M3 receptora (16). Takođe, primena neselektivnih antagonista može dovesti do izraženih antimuskarinskih efekata, kao što su suvoća usta, zamagljen vid, konstipacija (38). Ovi lekovi mogu izazvati i centralne efekte, poput kognitivnih oštećenja i povećati rizik od demencije i smrtnosti kod starijih osoba (38).

Izazov u postizanju visoke selektivnosti na ortosternom mestu podstakao je istraživače da preusmere napore na sintezu liganda koji se vezuju za alosterno mesto na receptoru (4). Alosterna vezivna mesta pokazuju manji stepen homologije između različitih podtipova mAChR od ortosternih mesta i pokazuju veći potencijal u postizanju selektivnosti (39). Ligandi koji se vezuju za alosterna mesta se nazivaju alosterni modulatori jer promenom konformacije receptora dovode do modulacije afiniteta ili efikasnosti ortosternog liganda (agonista ili antagonista) (4). Postoje različite vrste alosternih modulatora mAChR. Pozitivni alosterni modulatori (PAM) povećavaju afinitet ortosternih liganda za receptor (40). Ovi modulatori mogu poboljšati i efikasnost ortosternih liganda, što dovodi do snažnijeg odgovora (40). Negativni alosterni modulatori (NAM) smanjuju afinitet i/ili efikasnost ortosternih liganda za receptor (4). Postoje i neutralni alosterni modulatori koji ne utiču na aktivnost ortosternih liganda (4). Pored sposobnosti da modulišu odgovor receptora u prisustvu ortosternog liganda, alosterni modulatori mogu biti i agonisti ili antagonisti mAChR u odsustvu ortosternog liganda (41).

Veliki napredak u istraživanju muskarinskih alosternih modulatora bilo je otkriće benzilhinolin karboksilne kiseline (BQCA) (42). Ovaj visokoselektivan M1 PAM doveo je do poboljšanja deficita pamćenja izazvanih skopolaminom, kao i do poboljšanja hiperlokomocije izazvane amfetamonom (43). Zbog niske penetracije u CNS i niske efikasnosti, nije ušao u kliničke studije (42). Nakon BQCA, sintetisan je MK-7622, koji je pokazao poboljšanje kognicije i visoku M1 selektivnost u animalnim modelima (44). Iako efikasan u animalnim modelima, MK-7622 u kombinaciji sa inhibitorom acetilholinesteraze, donezepilom, nije pokazao poboljšanje kognitivnih funkcija u II fazi kliničke studije na 240 pacijenata sa Alchajmerovom bolešću (44). Takođe, MK-7622 je doveo do više holinergičkih neželjenih efekata, kao i pojave konvulzija (44). Pretpostavlja se da su ovi neželjeni efekti posledica aktivacije M1 u odsustvu Ach, tj. MK-7622 je PAM sa agonističkom aktivnošću (44). Stoga je razvoj novih prokognitivnih lekova preusmeren na „čiste“ PAM koji ne aktiviraju M1 u odsustvu

Ach (45). Jedna takva, visokoselektivna supstanca VU0486846, ne ispoljava agonističku aktivnost u prefrontalnom korteksu i ne dovodi do konvulzija, za razliku od PAM sa agonističkom aktivnošću (45). Slična supstanca, VU319, takođe M1 PAM, dovela je do poboljšanja kognitivnih sposobnosti kod 52 zdrava dobrovoljca nakon jedne oralne doze (46). Pored prokognitivnih efekata, M1 PAM (npr. PF-06767832) pokazali su antipsihotična dejstva u animalnim studijama (47). Stoga treba razmotriti potencijalnu primenu M1 PAM i u lečenju pozitivnih, negativnih i kognitivnih simptoma shizofrenije (47).

Načinjeni su i naponi da se sintetišu M4 PAM za lečenje shizofrenije, ali sa daleko manjim uspehom. Prvi sintetisani M4 PAM su LY2033298 i VU0010010 (48). Nakon toga, sintetisani su VU0152099, VU0152100 i VU0467485/AZ13713945 koji, iako visokoselektivni, nisu ušli u kliničke studije na ljudima (npr. mala rastvorljivost, niska penetracija u CNS-u, potreba za visokim terapijskim dozama) (48). Uprkos navedenim preprekama, sintetisan je jedini M4 PAM u kliničkoj upotrebi, emraklidin (CVL-231). Rezultati završene Ib faze kliničke studije pokazuju da emraklidin dovodi do klinički i statistički značajnog poboljšanja simptoma kod pacijenata sa shizofrenijom u poređenju sa placeboom (49). Na osnovu ovih pozitivnih rezultata, u junu 2022. godine započete su dve placebo kontrolisane kliničke studije II faze sa emraklidinom, čiji je kraj najavljen za prvu polovinu 2024. godine.

Iako su do danas identifikovani mnogi selektivni alosterni modulatori mAChR, oni su uglavnom korišćeni za lečenje poremećaja CNS-a (6). Pored navedenih M1 PAM i M4 PAM, sintetisani su i brojni M2 PAM, kao i višestruki M5 PAM i NAM, ali nijedna od ovih supstanci još nije testirana u humanim studijama (16,50). Terapijska efikasnost M1 PAM i M4 PAM u ranim fazama kliničkih studija opravdava dalja istraživanja i karakterizaciju selektivnih muskarinskih alosternih modulatora koji bi mogli biti korisni u lečenju drugih bolesti u čijoj osnovi se nalazi poremećena holinergička transmisija (6).

Zaključak

Kao što je napisano u ovom mini-pregledu, budućnost razvoja lekova koji ciljaju mAChR pokazuje brojne terapijske prednosti, ali i izazove. Postizanje adekvatne koncentracije u ciljnim tkivima (pre svega u CNS-u), selektivnosti za određeni podtip receptora i inovativni terapijski pristup, kao što je alosterna modulacija, pružaju mogućnost za poboljšanje efikasnosti i bezbednosti ovih lekova. Kako mAChR zauzimaju centralno mesto u regulaciji brojnih fizioloških procesa, njihova uloga u terapiji određenih bolesti (npr. shizofrenije, bola i zavisnosti od psihoaktivnih supstanci) zahteva dalja istraživanja. Korišćenje terapijskog potencijala mAChR van tradicionalnih indikacija pokazuje uzbudljive mogućnosti za poboljšanje ishoda lečenja različitih oboljenja.

Literatura

1. Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A, Wess J. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(7):549-60.
2. Sriram K, Insel PA. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol*. 2018; 93(4):251-8.
3. Pedersen JE, Bergqvist CA, Larhammar D. Evolution of the Muscarinic Acetylcholine Receptors in Vertebrates. *eNeuro*. 2018; 5(5).
4. Jakubik J, El-Fakahany EE. Current advances in allosteric modulation of muscarinic receptors. *Biomolecules*. 2020; 10(2):325.
5. Jakubik J, El-Fakahany EE. Allosteric Modulation of GPCRs of Class A by Cholesterol. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(4):1953.
6. Bock A, Schrage R, Mohr K. Allosteric modulators targeting CNS muscarinic receptors. *Neuropharmacology*. 2018; 136(C):427-37.
7. Jones CK, Byun N, Bubser M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2012; 37(1):16-42.
8. Santiago LJ, Abrol R. Understanding G Protein Selectivity of Muscarinic Acetylcholine Receptors Using Computational Methods. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(21):5290.
9. Saternos HC, Almarghalani DA, Gibson HM, Meqdad MA, Antypas RB, Lingireddy A, et al. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiol Genomics*. 2018; 50(1):1-9.
10. Shibasaki M, Crandall CG. Mechanisms and controllers of eccrine sweating in humans. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010; 2(2):685-96.
11. Zhao LX, Ge YH, Xiong CH, Tang L, Yan YH, Law PY, et al. M1 muscarinic receptor facilitates cognitive function by interplay with AMPA receptor GluA1 subunit. *FASEB J*. 2018; 32(8):4247-57.
12. Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol*. 2006; 148(5):565-78.
13. Thomsen M, Sørensen G, Dencker D. Physiological roles of CNS muscarinic receptors gained from knockout mice. *Neuropharmacology*. 2018; 136(C):411-20.
14. Brannan SK, Sawchak S, Miller AC, Lieberman JA, Paul SM, Breier A. Muscarinic Cholinergic Receptor Agonist and Peripheral Antagonist for Schizophrenia. *N Engl J Med*. 2021; 384(8):717-26.
15. Garzón M, Pickel VM. Subcellular distribution of M2 muscarinic receptors in relation to dopaminergic neurons of the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol*. 2006; 498(6):821-39.
16. Palma JA. Muscarinic control of cardiovascular function in humans: a review of current clinical evidence. *Clin Auton Res*. 2024; 34(1):31-44.
17. Tanahashi Y, Komori S, Matsuyama H, Kitazawa T, Unno T. Functions of Muscarinic Receptor Subtypes in Gastrointestinal Smooth Muscle: A Review of Studies with Receptor-Knockout Mice. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(2).
18. Dean B, Scarr E. Muscarinic M1 and M4 receptors: Hypothesis driven drug development for schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2020; 288:112989.
19. Foster DJ, Gentry PR, Lizardi-Ortiz JE, Bridges TM, Wood MR, Niswender CM, et al. M5 receptor activation produces opposing physiological outcomes in dopamine neurons depending on the receptor's location. *J Neurosci*. 2014; 34(9):3253-62.
20. Foster DJ, Bryant ZK, Conn PJ. Targeting muscarinic receptors to treat schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2021; 405:113201.
21. Dwomoh L, Tejeda GS, Tobin AB. Targeting the M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuronal Signal*. 2022; 6(1):Ns20210004.
22. Noetzel MJ, Grant MK, El-Fakahany EE. Immediate and delayed consequences of xanomeline wash-resistant binding at the M3 muscarinic receptor. *Neurochemical research*. 2009; 34:1138-49.

23. Hartigan SM, Dmochowski RR. Gender specific pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for antimuscarinic drugs for overactive bladder treatment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2020; 16(2):103-10.
24. Johnson CR, Kangas BD, Jutkiewicz EM, Bergman J, Coop A. Drug Design Targeting the Muscarinic Receptors and the Implications in Central Nervous System Disorders. *Biomedicines.* 2022; 10(2):398.
25. Kaul I, Sawchak S, Correll CU, Kakar R, Breier A, Zhu H, et al. Efficacy and safety of the muscarinic receptor agonist KarXT (xanomeline-trospium) in schizophrenia (EMERGENT-2) in the USA: results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, flexible-dose phase 3 trial. *Lancet.* 2024; 403(10422):160-70.
26. Bartolini A, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C. Analgesic and antineuropathic drugs acting through central cholinergic mechanisms. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2011; 6(2):119-40.
27. Martino G, Puma C, Yu XH, Gilbert A-K, Coupal M, Markoglou N, et al. The M1/M4 preferring agonist xanomeline is analgesic in rodent models of chronic inflammatory and neuropathic pain via central site of action. *PAIN.* 2011; 152(12):2852-60.
28. Gomes F, Cheng SL. Pathophysiology, Therapeutic Targets, and Future Therapeutic Alternatives in COPD: Focus on the Importance of the Cholinergic System. *Biomolecules.* 2023; 13(3):476.
29. Donohue JF, Feldman G, Sethi S, Barnes CN, Pendyala S, Bourdet D, et al. Cardiovascular safety of revefenacin, a once-daily, lung-selective, long-acting muscarinic antagonist for nebulized therapy of chronic obstructive pulmonary disease: Evaluation in phase 3 clinical trials. *Pulm Pharmacol Ther.* 2019; 57:101808.
30. Welk B, Richardson K, Panicker JN. The cognitive effect of anticholinergics for patients with overactive bladder. *Nat Rev Urol.* 2021; 18(11):686-700.
31. Uwada J, Nakazawa H, Muramatsu I, Masuoka T, Yazawa T. Role of Muscarinic Acetylcholine Receptors in Intestinal Epithelial Homeostasis: Insights for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(7).
32. Heijman J, Kirchner D, Kunze F, Chrétien EM, Michel-Reher MB, Voigt N, et al. Muscarinic type-1 receptors contribute to I(K,ACh) in human atrial cardiomyocytes and are upregulated in patients with chronic atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2018; 255:61-8.
33. Prathumsap N, Ongnok B, Khuanjing T, Arinno A, Maneechote C, Apaijai N, et al. Acetylcholine receptor agonists provide cardioprotection in doxorubicin-induced cardiotoxicity via modulating muscarinic M2 and $\alpha 7$ nicotinic receptor expression. *Translational Research.* 2022; 243:33-51.
34. Burczyk MS, Burkhalter MD, Tena TC, Grisanti LA, Kauk M, Matysik S, et al. Muscarinic receptors promote pacemaker fate at the expense of secondary conduction system tissue in zebrafish. *JCI Insight.* 2019; 4(20).
35. Kusumoto FM, Schoenfeld MH, Barrett C, Edgerton JR, Ellenbogen KA, Gold MR, et al. 2018 ACC/AHA/HRS guideline on the evaluation and management of patients with bradycardia and cardiac conduction delay: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(7):e51-156.
36. Cassambai S, Mee CJ, Renshaw D, Hussain A. Tiotropium bromide, a long acting muscarinic receptor antagonist triggers intracellular calcium signalling in the heart. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019; 384:114778.
37. Ruan Y, Patzak A, Pfeiffer N, Gericke A. Muscarinic Acetylcholine Receptors in the Retina-Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(9):4989.
38. Bishara D. Anticholinergic action is rarely a good thing. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2023; 13:20451253231195264.
39. Gregory KJ, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol.* 2007; 5(3):157-67.
40. Kenakin T, Strachan RT. PAM-Antagonists: A Better Way to Block Pathological Receptor Signaling? *Trends Pharmacol Sci.* 2018; 39(8):748-65.
41. Conn PJ, Christopoulos A, Lindsley CW. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(1):41-54.
42. Ma L, Seager MA, Wittmann M, Jacobson M, Bickel D, Burno M, et al. Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(37):15950-5.
43. Conn PJ, Jones CK, Lindsley CW. Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30(3):148-55.
44. Voss T, Li J, Cummings J, Farlow M, Assaid C, Froman S, et al. Randomized, controlled, proof-of-concept trial of MK-7622 in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y).* 2018; 4:173-81.
45. Moran SP, Dickerson JW, Cho HP, Xiang Z, Maksymetz J, Remke DH, et al. M(1)-positive allosteric modulators lacking agonist activity provide the optimal profile for enhancing cognition. *Neuropsychopharmacology.* 2018; 43(8):1763-71.
46. Conley AC, Key AP, Blackford JU, Rook JM, Conn J, Lindsley CW, et al. Cognitive performance effects following a single dose of the M1 muscarinic positive allosteric modulator VU319. *Alzheimer's & Dementia.* 2020;16(S9):e045339.
47. Davoren JE, Garnsey M, Pettersen B, Brodney MA, Edgerton JR, Fortin J-P, et al. Design and synthesis of γ - and δ -lactam M1 positive allosteric modulators (PAMs): convulsion and cholinergic toxicity of an M1-selective PAM with weak agonist activity. *J Med Chem.* 2017; 60(15):6649-63.
48. Yang Q, Lachapelle EA, Kablaoui NM, Webb D, Popielek M, Grimwood S, et al. Discovery of selective M4 muscarinic acetylcholine receptor agonists with novel carbamate isosteres. *ACS Med Chem Lett.* 2019; 10(6):941-8.
49. Krystal J, Kane JM, Correll CU, Walling DP, Leoni M, Duvvuri S. CVL-231 as a novel positive allosteric modulator targeting M4 muscarinic receptors: results from a phase 1b trial in patients with schizophrenia. *Hybrid Congress of the Schizophrenia International Research Society, Florence, Italy;* 2022.
50. Bender AM, Garrison AT, Lindsley CW. The Muscarinic Acetylcholine Receptor M(5): Therapeutic Implications and Allosteric Modulation. *ACS Chem Neurosci.* 2019; 10(3):1025-34.